



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Resistencia microbiana y capacidad de formación de biopelículas de cepas de *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* aisladas de carnes frescas provenientes de mercados de Lima Metropolitana

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Alberto Noé CONISLLA VIGO

Richard Kevin GUERRA CABALLERO

ASESOR

Dra. Mirtha ROQUE ALCARRAZ

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Conislla A, Guerra R. Resistencia microbiana y capacidad de formación de biopelículas de cepas de *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* aisladas de carnes frescas provenientes de mercados de Lima Metropolitana [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2019.

Hoja de metadatos complementarios

-Código ORCID del autor (dato opcional):

Ninguno

-Código ORCID del asesor o asesores (dato obligatorio):

Dra. Mirtha Roque Alcarraz (Asesora de Tesis): 0000-0001-9154-5767

-DNI del autor:

47832363

-Grupo de investigación:

Ninguno

-Institución que financia parcial o totalmente la investigación:

Ninguno

-Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación. Debe incluir localidades y/o coordenadas geográficas:

Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos: 12°03'00"S 77°02'00"O

-Año o rango de años que la investigación abarcó:

2019



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Decanato



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

Resistencia microbiana y capacidad de formación de biopelículas de cepas de *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* aisladas de carnes frescas provenientes de mercados de Lima Metropolitana

Que presentan los Bachilleres en Farmacia y Bioquímica:

**ALBERTO NOÉ CONISLLA VIGO Y
RICHARD KEVIN GUERRA CABALLERO**

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

DIECIOCHO (18) – SOBRESALIENTE

en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico(a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 19 de diciembre de 2019


Dra. María Elena Salazar Salvatierra
Presidenta


Mg. Luz Fabiola Guadalupe Sifuentes de Posadas
Miembro


Mg. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz
Miembro


Q.F. Teresa Celina Gallardo Jugo
Miembro

"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"



DEDICATORIA

A Dios, por siempre guiar mi camino y brindarme las fuerzas y motivación durante el desarrollo de la tesis.

A mis padres Dionisio Fausto y Santos Cristina, por su apoyo incondicional, amor y buen ejemplo que me siguen dando y me ayuda a siempre seguir adelante.

A mis hermanas María y Elizabeth, por sus consejos, apoyo y comprensión durante mi desarrollo personal y académico.

A mis sobrinos Billy, Valentina y Alvaro, que están motivándome en todo momento y que podrán contar conmigo siempre y estaré ahí para apoyarlos en todo lo que se propongan.

Alberto Noé Conislla Vigo

DEDICATORIA

En primer lugar, a Dios por ser mi guía y fuente de inspiración.

A mis amados padres, Carlos y Consuelo quienes con su paciencia y esfuerzo me han permitido concluir uno de mis sueños más grandes y agradecerles por inculcarme el ejemplo de esfuerzo y valentía.

A mi querido hermano Carlos, por su cariño y apoyo durante todo este proceso, por estar conmigo en todo momento.

A mi compañera de vida Mariangelica, por ser el apoyo incondicional en mi vida y que con su amor y respaldo, me ayuda alcanzar mis objetivos.

Richard Kevin Guerra Caballero

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento especial a la Dra. Mirtha Roque Alcarraz, por brindarnos su apoyo, orientación, compartir sus conocimientos y su experiencia profesional durante el desarrollo de esta tesis.

A los distinguidos Miembros del Jurado Examinador y Calificador:

Dra. María Elena Salazar Salvatierra

Mg. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz

Mg. Luz Fabiola Guadalupe Sifuentes de Posadas

Q.F. Teresa Celina Gallardo Jugo

Por las sugerencias y recomendaciones en la revisión de la tesis.

A los docentes y asistentes del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica-UNMSM, por su disposición y apoyo brindado durante la ejecución de la tesis.

INDICE

RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
INDICE DE FIGURAS.....	ix
INDICE DE TABLAS.....	xi
ABREVIATURAS.....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Objetivo General.....	2
1.2 Objetivos Especificos.....	2
2. GENERALIDADES.....	3
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	3
2.1.1 Características microbiológicas.....	3
2.1.2 Factores de virulencia.....	3
2.1.3 Serotipos.....	5
2.1.4 Intoxicación alimentaria por <i>Staphylococcus aureus</i>	5
2.1.4.1 Manifestaciones clínicas.....	5
2.1.4.2 Patogenia.....	6
2.1.5 Epidemiología en el Perú y el mundo.....	7
2.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	9
2.2.1 Características microbiológicas.....	9
2.2.2 Factores de virulencia.....	11
2.2.3 Serotipos.....	11
2.2.4 Intoxicación alimentaria por <i>Listeria monocytogenes</i>	12
2.2.4.1 Manifestaciones clínicas.....	12
2.2.4.2 Patogenia.....	13
2.2.5 Epidemiología en el Perú y el mundo.....	14
2.3 Resistencia antimicrobiana.....	16
2.3.1 Definición.....	16
2.3.2 Tipos de resistencia.....	16
2.3.3 Mecanismo de resistencia antimicrobiana.....	17

2.3.4 Mecanismo de resistencia de <i>Staphylococcus aureus</i> a antimicrobianos..	19
2.3.5 Mecanismo de resistencia de <i>Listeria monocytogenes</i> a antimicrobianos..	23
2.3.6 Principales causas que favorecen la aparición y propagación de la resistencia.....	23
2.3.7 Consecuencias de la resistencia antimicrobiana transmitida por alimentos.....	26
2.3.8 Consideraciones para la selección de los discos de sensibilidad antibiotica.....	26
2.4 Biopelículas.....	27
2.4.1 Definición.....	27
2.4.2 Composición y estructura.....	27
2.4.3 Etapas de desarrollo.....	29
2.4.4 Propiedades.....	30
2.4.5 Biopelículas en la industria de alimentos.....	31
2.4.6 Métodos de cuantificación de biopelículas de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Listeria monocytogenes</i>	33
3. METODOLOGÍA.....	35
3.1 Diseño.....	35
3.2 Materiales.....	35
3.2.1 Material biológico.....	35
3.2.2 Medios de cultivo.....	35
3.2.3 Equipos.....	36
3.2.4 Reactivos.....	36
3.2.5 Otros materiales.....	36
3.3 Plan de muestreo y tamaño de la muestra.....	37
3.4 Transporte de las muestras.....	38
3.5 Lugar de ejecución.....	38
3.6 Metodología de trabajo.....	38
3.6.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	38
3.6.1.1 Aislamiento.....	38

3.6.1.2 Pruebas de identificación.....	39
3.6.1.3 Prueba de sensibilidad por el método de Kirby Bauer.....	40
3.6.1.4 Prueba de capacidad de formación de biopelículas por el método de microtitulación en placa.....	42
3.7.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	43
3.7.2.1 Aislamiento.....	43
3.7.2.2 Pruebas de identificación.....	44
3.7.2.3 Prueba de sensibilidad por el método de Kirby Bauer.....	45
3.7.2.4 Prueba de capacidad de formación de biopelículas por el método de microtitulación en placa.....	46
4. RESULTADOS.....	51
5. DISCUSIÓN.....	70
6. CONCLUSIONES.....	77
7. RECOMENDACIONES.....	78
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
9. ANEXOS.....	93

RESUMEN

Las toxiinfecciones alimentarias generadas por los géneros *Staphylococcus* y *Listeria* constituyen un gran problema para la salud pública, debido a que pueden ser resistentes y formar biopelículas. La finalidad del presente estudio fue determinar la resistencia microbiana y capacidad de formar biopelículas de las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* aisladas de carnes frescas provenientes de tres mercados de Lima Metropolitana. Por eso se recolectaron 60 muestras que se distribuyó en tres grupos de 20 muestras de carne fresca (10 de pollo y 10 de cerdo) por cada mercado y se realizó el respectivo análisis microbiológico para identificarlos. Luego, se determinó la sensibilidad antimicrobiana por el método de Kirby Bauer según la CLSI y la formación de biopelículas por el método de microtitulación en placa, según las recomendaciones de Stepanovic *et al.* Se encontró incidencia de 75% para *S. aureus* y 13,33% para *L. monocytogenes*. Las cepas de *S. aureus*, presentaron resistencia a la penicilina (75,56%) y tetraciclina (28,89%); 97,78% al sulfametoxazol-trimetoprim, 82,22% para gentamicina y ciprofloxacino y 77,78% a la clindamicina. El 75% de las cepas de *L. monocytogenes* presentaron una resistencia a la clindamicina y ninguna presentó resistencia a la ampicilina, penicilina, tetraciclina, sulfametoxazol-trimetoprim, gentamicina, eritromicina y vancomicina. Se determinó que 33,33% de las cepas de *S. aureus* tienen capacidad fuerte, 28,89% capacidad moderada, 33,33% capacidad débil y 4,45% no tenían capacidad de formar biopelículas. En el caso de las cepas de *L. monocytogenes*, 100% presentó capacidad débil de formar biopelículas.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, incidencia, resistencia microbiana, biopelículas.

ABSTRACT

Food toxiinfections generated by the genera *Staphylococcus* and *Listeria* constitute a major problem for public health, because they can be resistant and form biofilms. The purpose of the present study was to determine the microbial resistance and ability to form biofilms of the strains of *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* isolated from fresh meats from three markets in Metropolitan Lima. Therefore, 60 samples were collected and distributed in three groups of 20 samples of fresh meat (10 chicken and 10 pork) for each market and the respective microbiological analysis was performed to identify them. Then, antimicrobial sensitivity was determined by the Kirby Bauer method according to the CLSI and biofilm formation by the plate microtiter method, according to the recommendations of Stepanovic *et al.* An incidence of 75% was found for *S. aureus* and 13.33% for *L. monocytogenes*. The *S. aureus* strains showed resistance to penicillin (75.56%) and tetracycline (28.89%); 97.78% to sulfamethoxazol-trimethoprim, 82.22% to gentamicin and ciprofloxacin and 77.78% to clindamycin. The 75% of the *L. monocytogenes* strains showed resistance to clindamycin and none presented resistance to ampicillin, penicillin, tetracycline, sulfamethoxazol-trimethoprim, gentamicin, erythromycin and vancomycin. It was determined that 33.33% of *S. aureus* strains have strong capacity, 28.89% moderate capacity, 33.33% weak capacity and 4.45% had no capacity to form biofilms. In the case of *L. monocytogenes* strains, 100% presented weak capacity to form biofilms.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, incidence, microbial resistance, biofilms.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de acción de la hemolisina- α (Hla).....	7
Figura 2. Serotipado basado en PCR de cepas de <i>L. monocytogenes</i> aisladas de alimentos, superficies ambientales y muestras biológicas.....	12
Figura 3. Modelo estructural actual de champiñón o tulipán	28
Figura 4. Fases de formación de biopelículas y estrategias de dispersión.....	30
Figura 5. Esquema para la determinación de <i>Staphylococcus aureus</i> en carnes frescas.....	49
Figura 6. Esquema para la determinación de <i>Listeria monocytogenes</i> en carnes frescas.....	50
Figura 7. Porcentaje de muestras de carnes frescas positivas al aislamiento de <i>Staphylococcus aureus</i> coagulasa positiva.....	51
Figura 8. Porcentaje de muestras positivas al aislamiento de <i>Staphylococcus aureus</i> coagulasa positiva por cada tipo de carne fresca.....	52
Figura 9. Porcentaje de resultados positivos y negativos al aislamiento de <i>S. aureus</i> coagulasa positiva en carnes frescas según el mercado de procedencia.....	52
Figura 10. Porcentajes de resistencia, sensibilidad y sensibilidad intermedia de cepas de <i>S. aureus</i> coagulasa positiva.....	58
Figura 11. Formación de biopelículas de <i>S. aureus</i> coagulasa positiva en microplaca de poliestireno que contiene TSB con glucosa 0.25% (DO 570 nm).....	61
Figura 12. Porcentaje de muestras de carnes frescas positivas al aislamiento de <i>Listeria monocytogenes</i>	62
Figura 13. Porcentaje de muestras positivas al aislamiento de <i>Listeria monocytogenes</i> por cada tipo de carne fresca.....	63
Figura 14. Porcentaje de resultados positivos y negativos al aislamiento de <i>Listeria monocytogenes</i> en carnes frescas según el mercado de procedencia.....	63
Figura 15. Porcentajes de resistencia, sensibilidad y sensibilidad intermedia de cepas de <i>Listeria monocytogenes</i>	68
Figura 16. Crecimiento en agar Baird Parker.....	99
Figura 17. Tinción Gram de <i>Staphylococcus aureus</i>	99

Figura 18. Prueba de coagulasa.....	100
Figura 19. Prueba en agar DNA.....	100
Figura 20. Prueba en agar Manitol Salado.....	101
Figura 21. Prueba de sensibilidad por el método de Kirby Bauer para <i>Staphylococcus aureus</i>	101
Figura 22. Capacidad de formación de biopelículas de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	102
Figura 23. Crecimiento en agar Oxford.....	104
Figura 24. Tinción Gram de <i>Listeria monocytogenes</i>	104
Figura 25. Prueba de catalasa.....	105
Figura 26. Fermentación de carbohidratos al 5% en caldo púrpura de bromocresol.....	105
Figura 27. Crecimiento en agar Sangre.....	106
Figura 28. Prueba de Movilidad.....	106
Figura 29. Prueba de CAMP.....	107
Figura 30. Prueba de sensibilidad por el método de Kirby Bauer para <i>Listeria monocytogenes</i>	107
Figura 31. Capacidad de formación de biopelículas de cepas de <i>Listeria monocytogenes</i>	108

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores de virulencia de <i>S. aureus</i> y sus características.....	4
Tabla 2. Diferenciación de las especies del género <i>Listeria</i>	10
Tabla 3. Genes de resistencia y elemento genéticos móviles presentes en <i>S. aureus</i>	22
Tabla 4. Factores identificados como impulsores de la resistencia antimicrobiana.....	25
Tabla 5. Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> en carnes frescas en UFC/g	53
Tabla 6. Pruebas de identificación de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	54
Tabla 7. Perfil de sensibilidad antimicrobiana de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> coagulasa positiva.....	56
Tabla 8. Sensibilidad antimicrobiana de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> coagulasa positiva en porcentaje.....	57
Tabla 9. Cepas de <i>S. aureus</i> coagulasa positiva formadoras de biopelículas empleando como medio TSB con glucosa al 0.25%.....	60
Tabla 10. Presencia o Ausencia de <i>Listeria sp.</i> aisladas de carnes frescas.....	64
Tabla 11. Pruebas de identificación de cepas de <i>Listeria sp.</i> aisladas de carnes frescas.....	65
Tabla 12. Perfil de sensibilidad antimicrobiana de cepas de <i>Listeria monocytogenes</i>	67
Tabla 13. Sensibilidad antimicrobiana de cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> en porcentaje.....	67
Tabla 14. Cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> formadoras de biopelículas empleando como medio BHI.....	69
Tabla 15. Antimicrobianos y diámetros críticos para <i>Staphylococcus spp.</i>	97
Tabla 16. Antimicrobianos y diámetros críticos para <i>Listeria spp.</i>	98

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

ATCC: American Type Culture Collection

BAM: Bacteriological Analytical Manual (Manual de Bacteriología Analítica)

BHI: Brain Heart Infusion (Infusión Cerebro Corazón)

CAMP: Christie-Atkins-Munch-Peterson

CDC: Centers for Disease Control and Prevention (Centros para el Control y Prevención de Enfermedades)

DO: Densidad óptica

DOC: Optical density cut-off (Punto de corte de densidad óptica)

FDA: Food and Drug Administration

EPS: Exopolisacárido

ETA: Enfermedades Transmitidas por Alimentos

IAE: Intoxicación Alimentaria Estafilocócica

ICMSF: International Commission on Microbiological Specifications for Foods (Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos)

LLO: Listeriolisina O

OMS: Organización Mundial de Salud

PBS: Phosphate Buffered Saline (Solución Salina Amortiguada por Fosfatos)

SNC: Sistema Nervioso Central

SPE: Sustancias Poliméricas Extracelular

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences (Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales)

TSA: Tryptic Soy Agar (Agar Tripticasa de Soya)

TSB: Tryptic Soy Broth (Caldo Tripticasa de Soya)

1. INTRODUCCIÓN

Las ETA constituyen un gran problema para la salud pública por ser consideradas de carácter social, tecnológico, económico, cultural y político¹.

En los países en vías de desarrollo es frecuente la incidencia de diversas enfermedades causadas por la ingesta de alimentos que no reúnen la calidad e inocuidad apropiada, en especial en aquellos alimentos que se venden en las calles o negocios públicos².

Las toxiinfecciones alimentarias provocadas por los microorganismos patógenos del género *Staphylococcus* y *Listeria* tienen gran importancia en la industria alimentaria dado que su presencia en los alimentos se asocia directamente a una inadecuada manipulación o al empleo de materias primas contaminadas³.

En los diferentes países las entidades de salud pública reportan como tercera causa de enfermedades transmitidas por alimentos de origen bacteriano a *Staphylococcus aureus*, ya que esta bacteria es responsable de causar intoxicaciones debido a la presencia de toxinas preformadas en el alimento⁴.

En el caso de la listeriosis que se da por el consumo de alimentos que están contaminados con *L. monocytogenes*, se caracteriza por ser una infección de baja morbilidad, pero con una alta tasa de mortalidad de alrededor de 20-30 %⁴.

La resistencia a los antimicrobianos es un gran problema para la salud pública, ya que ocasiona una reducción en la eficacia de los medicamentos, haciendo que las infecciones y enfermedades sean difíciles o imposibles de tratar⁵. En relación a los alimentos, los investigadores han postulado que estos pueden actuar como un vector o reservorio de microorganismos para los humanos, además hay que tener en cuenta que estas bacterias (*Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*) tienen una predisposición a formar biopelículas por lo que pueden generar resistencia a los procesos de limpieza, a los desinfectantes e incluso a algunos antimicrobianos, esto se debería a que estas biopelículas se adhieren a las distintas superficies, lo cual ayuda para que puedan colonizar los distintos materiales que usa la industria de alimentos⁵.

Por lo expuesto, es necesario la evaluación de la resistencia microbiana y su capacidad de formación de biopelículas de *S. aureus* y *L. monocytogenes* aisladas de carne fresca de pollo y de cerdo, ya que el consumo de estas carnes es masivo en la población peruana^{6, 7}, y de no llevarse a cabo una correcta manipulación de estos alimentos teniendo en cuenta los principios de buenas prácticas de higiene, esto supondría un grave riesgo para la población.

1.1 Objetivo General

- Determinar la resistencia microbiana y capacidad de formación de biopelículas de las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* aisladas de carnes frescas provenientes de mercados de Lima Metropolitana

1.2 Objetivos Específicos

- Aislar e identificar las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* en carnes frescas de pollo y cerdo mediante el empleo de medios selectivos y pruebas bioquímicas.
- Determinar la incidencia de las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* en carnes frescas de pollo y cerdo provenientes de mercados de Lima Metropolitana.
- Determinar el perfil de resistencia de las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* aisladas de carnes frescas frente a los antimicrobianos seleccionados.
- Evaluar la capacidad de formación de biopelículas de las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* aisladas de carnes frescas.

2. GENERALIDADES

2.1 *Staphylococcus aureus*

2.1.1 Características microbiológicas

De acuerdo a su taxonomía, el género *Staphylococcus* está incluido en la familia *Micrococcaceae*. Son cocos Gram positivos de 0,5 a 1,5 μm de diámetro que se agrupan en racimos y se caracterizan porque son inmóviles, anaerobios facultativos, fermentadores de glucosa, positivos para catalasa y negativos para oxidasa, con un contenido de G+C de 30 a 39 % ^{8,9}.

Son bacterias que no forman esporas, sin embargo, es común encontrarlos en la naturaleza ya que estos pueden sobrevivir en ambientes hostiles fuera del cuerpo, además de ser resistentes a muchos desinfectantes⁸.

De este género, *Staphylococcus aureus* es la especie más virulenta porque induce alteraciones en los tejidos y produce lesiones localizadas con supuración y cicatrización, y es responsable de varias infecciones en el humano. Tiene la capacidad de colonizar varios sitios de la mucosa del cuerpo como en las fosas nasales, la garganta, áreas específicas de la piel (incluidas la axila, la ingle y el perineo) y recto^{9,10}.

2.1.2 Factores de virulencia

S. aureus se caracteriza por tener múltiples factores de virulencia, lo cual permite que causa una amplia gama de infecciones en humanos y animales. Estos ayudan en la unión a las células del huésped, destruyendo el escudo inmune del huésped, invadiendo el tejido, causando sepsis y provocando síndromes mediados por toxinas. Esta es la base para las infecciones estafilocócicas persistentes sin una fuerte respuesta inmune del huésped. En función de su mecanismo de acción y función en la patogénesis, los factores de virulencia estafilocócica se clasifican como se representa en la Tabla 1.¹¹

Tabla 1. Factores de virulencia de *S. aureus* y sus características

Factores		Características
Ayuda al apego a los tejidos del huésped	Componentes de superficie microbiana que reconocen moléculas de matriz adhesiva (MSCRAMM)	Las proteínas de la superficie celular que interactúan con las moléculas del huésped, como el colágeno, la fibronectina y el fibrinógeno, facilitan la unión del tejido. La proteína estafilocócica A, las proteínas de unión a fibronectina A y B, la proteína de unión a colágeno y el factor de agrupación A y B pertenecen a esta familia. También están involucrados en la evasión inmune del huésped.
	Microcápsula de polisacárido	Resistir la fagocitosis y la muerte por fagocitos polimorfonucleares.
Romper / evadir la inmunidad del huésped	Proteína A	Se une a la porción Fc de la inmunoglobulina, previene la opsonización, funciona como super antígeno y limita la respuesta inmune del huésped.
	Panton-Valentine leucocidina (PVL)	PVL se encuentra en la mayoría de MRSA asociado a la comunidad (CA-MRSA). PVL pertenece al grupo de poros de membrana que forman proteínas. Se compone de dos componentes proteicos (LukS-PV y LukF-PV) que actúan juntos como subunidades y forman porinas en la membrana celular de las células huésped, lo que conduce a la fuga del contenido celular y la muerte celular.
	α -toxina (α - hemolisina)	Fue la primera exotoxina bacteriana que se identificó como un formador de poros de la membrana celular que causa la fuga celular y la muerte.
	Proteína inhibidora de la quimiotaxis de <i>S. aureus</i> (CHIPS)	CHIPS es una proteína extracelular que inhibe el funcionamiento de la quimiotaxis de neutrófilos y monocitos.
Invasión de tejidos	Proteína de adherencia extracelular (Eap)	Una exoproteína que se une a la matriz de la célula huésped, a las proteínas plasmáticas y a la molécula de adhesión celular endotelial ICAM-1. Además de los roles de adhesión e invasión, también tiene actividad inmunomoduladora.
	Proteasas, lipasas, nucleasas, hialuronatelasas, fosfolipasa C, metaloproteasas (elastasa) y estafiloquinasa	Estas enzimas extracelulares causan la destrucción del tejido y, por lo tanto, ayudan en la penetración bacteriana en los tejidos.
Induce la toxinosis	Enterotoxinas	<i>S. aureus</i> produce una batería de enterotoxinas que son exotoxinas gastrointestinales potentes. La intoxicación alimentaria estafilocócica es una intoxicación que resulta del consumo de alimentos que contienen una cantidad suficiente de enterotoxinas preformadas.
	Síndrome de shock tóxico toxina -1 (TSST-1)	TSST-1 y algunas de las enterotoxinas se denominan super antígenos de toxinas pirogénicas. TSST-1 causa el síndrome de shock tóxico, especialmente en mujeres menstruales.
	Toxinas exfoliativas A y B	Serina proteasas que reconocen e hidrolizan selectivamente las proteínas desmosómicas en la piel. Los extraterrestres causan el síndrome de la piel escaldada por estafilococos, una enfermedad que afecta predominantemente a los bebés.

Adaptado de Gnanamani et al¹¹

2.1.3 Serotipos

De este microorganismo, se han propuesto trece serotipos de polisacáridos capsulares sobre la base de la reactividad aglutinante con antisuero de conejo adsorbido y precipitación en doble inmunodifusión. De estos serotipos, los más predominantes son los serotipos capsulares 5 y 8, que están asociados en las infecciones en humanos y animales. Además se han descrito 8 serotipos de enterotoxinas estafilocócicas (A, B, C, D, E, G, H, I) siendo el serotipo A el más común de todos ellos. Son termoestables y resistentes a las enzimas digestivas, siendo responsables de intoxicación alimentaria con emesis y cuadros de enterocolitis^{12,13,14}.

2.1.4 Intoxicación alimentaria por *Staphylococcus aureus*

Las ETA por *Staphylococcus aureus*, el cual es un microorganismo comensal que coloniza la piel, las mucosas y, persistentemente, las fosas nasales anteriores del 20 al 30% de la población mundial. La ingestión de las toxinas por este microorganismo es llamada como estafiloenterotoxiosis o estafiloenterotoxemia, que ponen en riesgo la vida de los seres humanos y los animales. La intoxicación alimentaria estafilocócica (IAE) de origen alimentario es una de las enfermedades transmitidas por alimentos más frecuentes en el mundo. En general, es una enfermedad autolimitada, que se inicia con vómitos violentos, después de un período corto de incubación de 2 a 6 horas a partir de la ingestión del alimento contaminado, puede producir también una gastroenteritis aguda. En la mayoría de los casos los síntomas remiten después de 24 horas^{15, 16}.

2.1.4.1 Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas que se producen son náuseas, vómitos intensos, espasmo abdominal y diarrea. Por lo general, son de evolución favorable entre 24 y 48 horas, y pueden producir formas graves con hipotensión, hipotermia y shock. Sin embargo, a lo largo de los años se ha informado la capacidad de *S. aureus* para formar biopelículas y la aparición de cepas resistentes a múltiples antimicrobianos, que son las razones principales por la cual estas infecciones son cada vez más difíciles de tratar y su frecuencia está aumentando^{16,17}.

2.1.4.2 Patogenia

La patogenia causada por *Staphylococcus aureus* ocurre por la interacción de los factores de virulencia con las defensas del hospedero bajas. El proceso de las infecciones por este microorganismo implica cinco etapas: colonización, infección local, diseminación sistémica y/o sepsis, infecciones metastásicas y toxinosis. El organismo está en estado de portador en las fosas nasales y puede permanecer así sin causar infecciones durante semanas o meses. La colonización procede a la infección bajo ciertos factores predisponentes, como la hospitalización prolongada, la supresión inmune, las cirugías, el uso de dispositivos médicos invasivos y las enfermedades metabólicas crónicas. El absceso cutáneo localizado se desarrolla cuando el organismo se inocula en la piel desde un sitio de transporte. Esto puede extenderse aún más y dar lugar a diversas manifestaciones clínicas de infecciones localizadas, como celulitis o infección de la herida. El organismo puede ingresar a la sangre y diseminarse sistémicamente a diferentes órganos causando sepsis. Esta diseminación hematógena puede provocar endocarditis, osteomielitis, artritis séptica y absceso epidural. Sin una infección del torrente sanguíneo, pueden ocurrir síndromes específicos debido a las toxinas celulares de este microorganismo. Estos son el síndrome de shock tóxico, el síndrome de la piel escaldada y la gastroenteritis transmitida por los pies^{11,17}.

Las toxinas son capaces de dañar las membranas celulares del huésped, ya sea degradando las conexiones intercelulares o modulando las respuestas inmunes. Entre estas toxinas se encuentra la hemolisina- α (Hla o α -toxina), que es un beta-barril que forma toxinas secretadas como un monómero soluble en agua y por sí sola no se considera tóxica, es su capacidad de unión y oligomerización en una estructura heptamérica en la membrana de la célula huésped lo que la hace peligrosa. Cuando Hla se une a su célula objetivo, se oligomeriza a una estructura previa a los poros y ataca la membrana celular mediante la extrusión del barril β a través de la bicapa lipídica para formar un canal transmembrana hidrofílico como se observa en la Figura 1.¹⁷

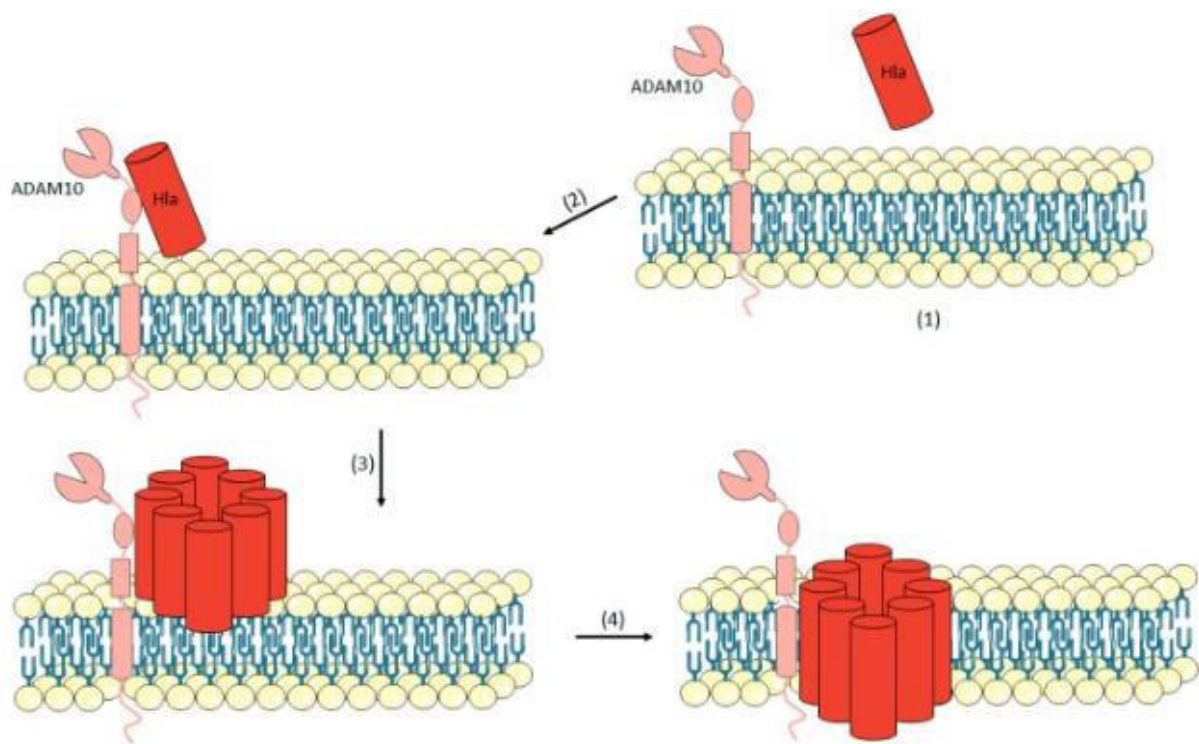


Figura 1. Mecanismo de acción de la hemolisina- α (Hla). Hla se secreta como un monómero soluble en agua (1). Hla se une a la proteína transmembrana ADAM10, que es un receptor celular para la toxina α (2). Luego, la toxina se oligomeriza en un heptámero en la membrana plasmática y se forma un pre-poro (3) y, al final, se produce la formación del canal transmembrana (4).

Recuperado de Oliveira et al ¹⁷

2.1.5 Epidemiología en el Perú y el mundo

A nivel mundial, las intoxicaciones alimentarias causadas por *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico (SAE) no son notificadas a los sistemas de vigilancia epidemiológica. Esto se debe principalmente, a que la recuperación normalmente ocurre sin suministro de medicamentos y, frecuentemente, los organismos de salud no la incluyen dentro de las enfermedades de declaración obligatoria, tal como sucede en Estados Unidos. En este país, se estima que la IAE corresponde alrededor de 14% del total de las ETA, representando la tercera causa más común en infecciones

bacterianas. Por otro lado, en Francia y Corea, el *Staphylococcus aureus* constituye el segundo agente etiológico de las ETA^{16, 18}.

En Chile, hasta septiembre de 2016, se registraron 885 brotes de ETA con 4.705 casos asociados. De estos, 30% han sido clasificados con un diagnóstico clínico específico, observándose 16 brotes asociados a *S. aureus*¹⁶.

En el Perú, durante el período 2014-2018, fueron notificados a través del sistema SIEpi-BROTOS del Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades (CDC MINSA) un total de 234 brotes de ETA a nivel nacional, donde uno de los patógenos involucrados de estos brotes fue el *Staphylococcus aureus*¹⁹.

En general, se reportó un promedio de 47 brotes anuales, 6 098 personas afectadas, 1311 hospitalizados y 29 defunciones en todo el país, donde estaban involucrados los agentes más comunes causantes de ETA. De acuerdo a su distribución, 23 departamentos fueron afectados, siendo Lima el que presentó el mayor número de brotes (22,2 %), seguido de Cusco (11,1 %) y Cajamarca (8,5 %); mientras que los departamentos de la Libertad, Puno y Tacna solo reportaron 01 brote (0,4 %) en estos años¹⁹.

2.2 *Listeria monocytogenes*

2.2.1 Características microbiológicas

Listeria monocytogenes es un bacilo gram positivo, patógeno, facultativo intracelular y oportunista, que puede crecer a temperaturas de 0 a 45 °C, con una temperatura óptima de 30 a 37 °C y tiene la capacidad de soportar temperaturas de refrigeración. Es capaz de crecer a pH de 4,4 a 9,6; y desarrollarse en altas concentraciones de cloruro de sodio 15 %²⁰.

Es un microorganismo ambiental que tiene la capacidad de adherirse a las superficies para poder formar biopelículas y así protegerse de la acción de los tratamientos con antimicrobianos²⁰.

Existen diferentes especies de *Listeria* como se observa en la Tabla 2, que comparten características morfológicas como bioquímicas. Algunas de estas características, se han usado para la diferenciación de otros microorganismos que son reacción de catalasa positiva, prueba de indol y oxidasa negativa, hidrólisis de esculina, pero no de urea. Por otro parte, *Listeria spp.* poseen propiedades bioquímicas diferentes que permiten la diferenciación entre especies patógenas y no patógenas, que pueden ser variable en su capacidad para fermentar L-ramnosa, D-xilosa, y alfa-metil-D-manopiranosido y actividades hemolítica, lecitinasa, y la fosfolipasa C^{21, 22}.

Un ejemplo sería *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* que se diferencian de otras especies de *Listeria*, porque muestran variaciones significativas en su capacidad de producir una amplia, clara o doble zona de hemólisis en agar sangre, y entre ellas en la capacidad de producir ácido a partir de L-ramnosa, D-xilosa y alfa-metil-D-manósido. Otro ejemplo es *L. innocua* y *L. welshimeri* que se distinguen de *L. monocytogenes* por su beta hemólisis negativa y sus características de fermentación. Además, *L. ivanovii* se diferencia de *L. monocytogenes* por su reacción fuerte de lecitinasa con o sin agregar carbón vegetal en el medio, comparado con *L. monocytogenes*, que necesariamente requiere carbón para su reacción lecitinasa. En la prueba de CAMP, *L. monocytogenes* y *L. seeligeri* dan reacción positiva con *Staphylococcus aureus* y reacción negativa en la prueba CAMP con *Rhodococcus equi*, mientras que *L. ivanovii* da una prueba de CAMP positiva con *R. equi* y prueba de CAMP negativa con *S. aureus*. Y las demás especies de *Listeria* son prueba de CAMP negativo^{21, 22}.

Tabla 2. Diferenciación de las especies del género *Listeria*

Especies	Manitol	Ramnosa	Xilosa	β - hemólisis ^a	Mejora de la hemólisis con <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> (S)	Mejora de la hemólisis con <i>Rhodococcus</i> <i>equi</i> (R)
<i>L. monocytogenes</i>	-	+ ^b	-	+	+	- ^c
<i>L. ivanovii</i> ^d	-	-	+	+	-	+
<i>L. innocua</i>	-	V ^e	-	-	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	V	+	-	-	-
<i>L. seeligeri</i>	-	-	+	+ ^f	+	-
<i>L. Grayi</i> ^g	-	V	-	-		

^a Puñal de agar sangre de oveja

^b Algunas cepas del linaje III de *L. monocytogenes*, que están asociadas principalmente con la listeriosis animal, son menos de la ramnosa.

^c Las cepas raras son S + y R +. La reacción R + es menos pronunciada que la de *L. ivanovii*.

^d Las cepas fermentadoras de ribosa se clasifican como *L. ivanovii* subsp. no fermentadores de ivanovii y ribosa como *L. ivanovii* subsp. Londiniensis.

^e V, biotipos variables, más de 10% de las cepas para este rasgo.

^f Las cepas de *L. seeligeri* débilmente hemolíticas pueden aparecer no hemolíticas.

^g Incluye dos subespecies - *L. grayi* subsp. *murrayi* reduce nitrato *L. grayi* subsp. *grayi* no reduce el nitrato.

Adaptado de Hitchins et al²²

2.2.2 Factores de virulencia

La determinación del potencial patogénico de *L. monocytogenes* es importante por los factores de virulencia que presenta y la identificación de las cepas virulentas se puede lograr mediante el rastreo de algunos genes directamente relacionados con la patogenicidad de este microorganismo. *L. monocytogenes* entra en las células huésped mediante el uso de una familia de proteínas superficiales llamadas internalinas, especialmente InlA e InlB. Las internalinas putativas están codificadas por los genes InlC (lmo1786) e InlJ (lmo2821) que participan en las etapas postintestinales de la infección por *L. monocytogenes*. El organismo etiológico de la listeriosis humana alberga la InlJ (lmo2821). Además, este microorganismo lleva una toxina formadora de poros llamada listeriolisina O (LLO), que es vital para la virulencia de la bacteria. LLO lisa la membrana de la vacuola y finalmente ayuda a la entrada de la bacteria en el citoplasma²⁰.

2.2.3 Serotipos

En base a los antígenos somáticos (O) y flagelares (H), se pudieron identificar 13 serotipos en *Listeria monocytogenes* incluyendo 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e y 7. Con la ayuda del ensayo de PCR como se observa en la Figura 2, cuatro serotipos principales de las cepas de esta bacteria se pueden clasificar en cuatro serogrupos distintos: IIa (serotipos 1/2a, 1/2c, 3a y 3c), IIb (1/2b, 3b, 4b, 4d y 4e), IIc (1/2c y 3c), y IVb (4b, 4d y 4e) al apuntar a cuatro genes marcadores. Entre los 13 serotipos de *L. monocytogenes*, los serotipos 4b, 1/2a, 1/2b y 1/2c representan más del 95% de los aislamientos recuperados de alimentos, superficies ambientales y muestras biológicas^{20,23,24}.

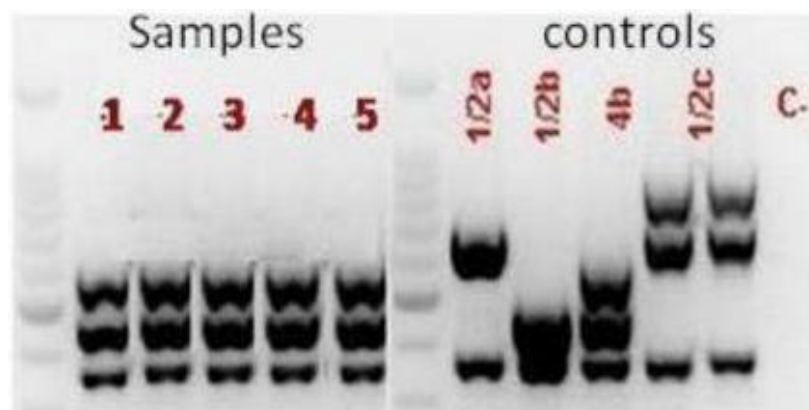


Figura 2. Serotipado basado en PCR de cepas de *L. monocytogenes* aisladas de alimentos, superficies ambientales y muestras biológicas
Recuperado de Sotgiu et al²⁴

2.2.4 Intoxicación alimentaria por *Listeria monocytogenes*

La enfermedad causada por la infección de esta bacteria es denominada listeriosis. Ésta se adquiere por ingestión de alimentos contaminados como carnes frías y calientes listas para el consumo, leche no pasteurizada y productos lácteos, frutas y vegetales crudos entre otros, pudiendo causar septicemia, bactericemia, gastroenteritis, meningitis, meningoencefalitis y abortos. El riesgo de listeriosis es muy elevado en mujeres embarazadas, neonatos, ancianos y, en general, en individuos inmunocomprometidos^{25,26}.

2.2.4.1 Manifestaciones clínicas

La principal vía de transmisión de *L. monocytogenes* es indirecta, por el consumo de alimentos contaminados. Se puede considerar que la listeriosis es una zoonosis, ya que hay poblaciones como veterinarios, trabajadores de granja o mataderos, que pueden contaminarse por contacto directo, por animales infectados con *Listeria*²⁰.

La listeriosis existe de dos tipos, que son la listeriosis no invasiva que se manifiesta por síntomas de gastroenteritis, como diarrea, fiebre, cefalea y mialgias, y su periodo de incubación suele ser corto; mientras que la listeriosis invasiva suele afectar a los grupos humanos más vulnerables como son las mujeres gestantes, niños neonatales,

ancianos, personas con el sistema inmunológico bajo y por fármacos como la cortisona o hábitos como el alcoholismo ^{27, 28}.

2.2.4.2 Patogenia

La patogenia de este microorganismo es compleja e incluye: adhesión a la célula hospedera e invasión (internalización), su fuga de las vacuolas fagocíticas, multiplicación intracelular y movilidad que le lleva propagarse de célula a célula. Una vez que un alimento contaminado es ingerido, la bacteria es fagocitada por las células gastrointestinales y se ha visto que causa su propia internalización a células no fagocíticas, donde evita ser destruida porque produce una hemolisina (listeriolisina) y fosfolipasas que degradan la membrana del fagosoma evitando su digestión intracelular. Siendo fagocitada por los macrófagos, escapa hacia su citoplasma donde se multiplica y prolifera para luego traspasar a las células adyacentes. A través de estos pasos, *L. monocytogenes* se puede multiplicar y diseminarse en el organismo sin haber sido expuesta a los anticuerpos, neutrófilos o antimicrobianos del líquido extracelular. Una vez que cruza la barrera intestinal, se disemina a la sangre y a los ganglios mesentéricos. De allí migra hacia el hígado y al bazo para multiplicarse dentro de los macrófagos hepáticos y esplénicos, respectivamente, o en las células epiteliales del parénquima. Si en este momento no actúa una eficiente respuesta del sistema inmune innato, la bacteria es capaz de evadir la respuesta inmune y continuar su multiplicación en el organismo. Este ciclo celular protege a esta bacteria de la inmunidad humoral y es responsable, en cambio, de la activación de inmunidad mediada por células T. La resistencia a la infección depende, entonces, de la inmunidad celular. Las células T citotóxicas (CD8+) reconocen y lisan células infectadas mientras las bacterias extracelulares son atacadas por fagocitos activados circulantes. En pacientes con disminución de la inmunidad celular no se logra controlar la multiplicación bacteriana y se produce bacteriemia e invasión de órganos, especialmente del cerebro y del útero grávido. Los individuos con disfunción de las células T tienen mayor riesgo de contraer la enfermedad^{25, 27}.

Muchos factores de virulencia de *L. monocytogenes* han estado implicados en la infección placentaria como por ejemplo, las internalinas (Inl) A, InlB e InlP, que han

demostrado contribuir a la invasión de células del trofoblasto, aunque muchos detalles sobre la infección vertical son desconocidos debido a las restricciones de efectuar estudios en humanos y a los distintos cambios placentarios que ocurren durante la gestación. Una vez que atraviesa la barrera materno-fetal, *L. monocytogenes* puede causar aborto espontáneo, muerte fetal intrauterina, parto prematuro e infección fetal diseminada con muerte fetal y neonatal, lo que ocurre en aproximadamente 20 a 60% de los casos. La infección puede ocurrir en cualquier momento durante el embarazo, pero con mayor frecuencia se detecta en el tercer trimestre²⁷.

El tiempo promedio de incubación de la listeriosis es de 3 semanas, con un rango que puede ir de 3 a 70 días, aunque esto dependerá de las características del paciente como por ejemplo el período de incubación para la enfermedad invasora es mayor en mujeres embarazadas (2 a 4 semanas) que en no embarazadas (1 a 14 días). El período de incubación para cuadros de gastroenteritis febriles autolimitadas seguida de la ingesta de grandes inóculos es de 24 horas, durando la enfermedad en estos casos 2 a 3 días^{26,27}.

2.2.5 Epidemiología en el Perú y el mundo

En 2019, los Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) en Estados Unidos ha investigado brotes de otras infecciones alimentarias por distintas cepas, entre ellas la *Listeria monocytogenes*, que infecta aproximadamente a 1600 personas al año en el país norteamericano. Además, en Junio de este mismo año, por ejemplo, las alarmas se encendieron en Reino Unido después de que cinco personas murieran a causa de esta bacteria por comer sándwiches empaquetados y distribuidos en varios hospitales del país²⁸.

En agosto del 2019 en España, la Junta de Andalucía declaró la Alerta de Salud Pública por un brote de toxiinfección alimentaria causado por *Listeria monocytogenes*, cuya fuente se había identificado en carne mechada que se identificó a raíz de la declaración de pequeños agrupamientos de casos de listeriosis que venían ocurriendo desde finales de Julio, en los que mediante la entrevista a los casos y la investigación epidemiológica se identificó como alimento sospechoso la carne mechada²⁹.

En un estudio efectuado en Brasil, se detectó *L. monocytogenes* en 3,1% de verduras listas para consumir. Además, muchos estudios en Latinoamérica coinciden en que existe un bajo reporte de casos y una subestimación del problema; sin embargo, se espera que, por las condiciones sanitarias de muchos países, la frecuencia y letalidad sea elevada en comparación con países desarrollados²⁷.

La presencia de *L. monocytogenes* como uno de los agentes causantes de ETA en Perú, tiene como principales fuentes de infección la ingesta de carne insuficientemente cocinada, frutas y hortalizas contaminadas, mariscos crudos, entre otros. Se estima que en el Perú fue notificado en los últimos 5 años a través del sistema de vigilancia epidemiológica, un promedio de 45 brotes de ETA, 65 % de los cuales se concentran en los departamentos de Lima (20,3 %), Junín (10,1 %), Cajamarca (9,6 %), Cusco (8,6 %), Huánuco (6 %), Loreto (5,6 %) y Piura (4,7 %)³⁰.

En el Perú, diversos estudios apoyarían lo anterior mencionado, como en un estudio, en el cual se permitió aislar *Listeria monocytogenes* en muestras de quesos frescos y se obtuvo una incidencia de 18,67% de diferentes mercados del Cercado de Lima³¹.

En otro estudio, se determinó que la incidencia de *L. monocytogenes* en Salchicha tipo Huacho, en los Mercados de Abastos del Cercado de Lima fue de 78%³².

En otro realizaron un estudio para determinar la presencia de esta bacteria en quesos frescos de producción artesanal expendidos en los mercados de Ica, encontrando una prevalencia de 4,05%³³.

2.3 Resistencia antimicrobiana

2.3.1 Definición

Se define como la capacidad de una bacteria para sobrevivir en concentraciones de antibiótico que inhiben/matan a otras de la misma especie³⁴.

Asimismo, la Organización Mundial de Salud (OMS) en un sentido más amplio, indica que la resistencia antimicrobiana abarca también las resistencias a fármacos utilizados para tratar infecciones causadas por otros microorganismos, tales como parásitos (por ejemplo, los helmintos o el parásito que causa el paludismo), virus (como el VIH) y hongos (como la candida)³⁵.

2.3.2 Tipos de resistencia

A.- Natural o intrínseca: Se denomina así a todos a aquellos mecanismos de defensa que se encuentran en la célula de forma natural, esta condición se encuentra universalmente en las especies bacterianas y es independiente a la selectividad de los antibióticos³⁴.

También se habla de una resistencia natural cuando todas las cepas pertenecientes a la misma especie son resistentes a un antibiótico³⁶.

B. Adquirida: Se basa en la adquisición de genes, los cuales son capaces de proveerles defensa ante una gran variedad de antibióticos. De acuerdo a las investigaciones, se propone que los microorganismos que adquirieron un grado de resistencia a un antibiótico, estos pueden de manera eficiente transferir este gen o genes de resistencia a otros microorganismos por medio de elementos genéticos móviles, que en el caso de las bacterias estas pueden ser adquiridos por plásmidos, DNA desnudos, bacteriófagos o transposones³⁶.

Así mismo, si la resistencia bacteriana sólo aparece en algunas cepas de una especie normalmente sensible se habla de resistencia adquirida³⁷.

2.3.3 Mecanismo de resistencia antimicrobiana

A.- Natural o intrínseca

A.1 Cambios en la membrana externa que afecta la permeabilidad:

Muchos de los antimicrobianos usados en la práctica clínica tienen objetivos bacterianos intracelulares, es decir, el compuesto debe de penetrar la membrana externa y/o citoplasma para ejercer su efecto antimicrobiano. Por ello, las bacterias han desarrollado mecanismos para evitar que el antibiótico alcance su objetivo intracelular o periplasmático y esto lo hace a través de la disminución de la permeabilidad de la membrana, limitando la entrada de sustancias desde el medio externo³⁸.

Como ejemplo podemos citar a la vancomicina, un antibiótico glicopeptídico, la cual no es activa contra los microorganismos gram-negativos debido a la falta de penetración a través de la membrana externa³⁸.

También se habla de una modificación de la bicapa lipídica a nivel de las porinas, que son las proteínas que forman canales que participan en la regulación de la entrada de ciertos elementos, como los antibióticos; empleando mecanismos como la limitación por tamaño, la hidrofobicidad y la repulsión por carga. Un ejemplo clásico de la resistencia mediada por la porina es la producción aberrante de OprD en *P. aeruginosa*, la cual se ha demostrado que las mutaciones en este gen oprD surgen en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* durante la terapia antimicrobiana con Imipenem³⁸.

A.2 Bomba de eflujo o expulsión:

La bomba de eflujo de salida, son proteínas capaces de eliminar una amplia variedad de compuestos (entre ellos el antibiótico) del periplasma a la célula externa, que evita que actúe en el sitio de acción³⁹.

Estos sistemas de eflujo pueden ser específicos del sustrato (para un antibiótico en particular, como los determinantes tet para los genes de tetraciclina y mef para macrólidos en neumococos) o con una amplia especificidad de sustrato, que generalmente se encuentra en las bacterias MDR (multidrogo resistentes)³⁹.

Este mecanismo de resistencia es particularmente importante en *P. aeruginosa* y *Acinetobacter spp*³⁹.

A.3 Alteraciones al sitio de acción:

Son mecanismos de mutación que se dan al azar, el cual consiste en una alteración en el sitio donde el antimicrobiano se va a unir a la bacteria. Teniendo como resultado que el antimicrobiano no se puede unir a la bacteria e interrumpiendo una función vital de ésta. Este tipo de mecanismo de autoresistencia actúa contra varias clases de antibióticos, incluidos β -lactámicos, glucopéptidos, macrólidos, lincosamidas y estreptograminas (MLS) y aminoglucósidos⁴⁰.

Como ejemplo tenemos a los glucopéptidos, como la vancomicina y la teicoplanina, quienes inhiben la transpeptidación y transglucosilación de la pared celular al asociarse con precursores de peptidoglucano (D-Ala - D-Ala), esta resistencia resulta de un cambio en el precursor del peptidoglucano de D-Ala - D-Ala a D-Ala - D-Lac o D-Ala - D-Ser, que tiene una reducción de 1000 y 6 veces en la afinidad por los glucopéptidos, respectivamente⁴¹.

A.4 Modificación enzimática del antibiótico:

Este mecanismo se basa en expresar enzimas capaces de generar cambios en la estructura del antibiótico haciendo que este pierda su funcionalidad³⁸.

Se han descrito muchos tipos de enzimas modificadoras, donde las reacciones bioquímicas más frecuentes que catalizan incluyen i) acetilación (aminoglucósidos, cloranfenicol, estreptograminas), ii) fosforilación (aminoglucósidos, cloranfenicol) y iii) adenilación (aminoglucósidos, lincosamidas). Independientemente de la reacción bioquímica, el fármaco pierde su funcionalidad debido a un impedimento estérico que disminuye la afección del fármaco por su diana³⁸.

B.- Adquirida

B.1 Conjugación:

Proceso mediado por plásmidos, elementos conjugativos, que tienen la propiedad de transferirse de una célula a otra gracias a un contacto cercano entre ambas células mediante un poro de conjugación o pili sexual³⁹.

B.2 Transformación:

Es la captura de ADN extracelular del medio, que puede integrarse en el genoma y expresarse⁴².

B.3 Transducción:

Es la transferencia de material genético de una bacteria a otra mediante un virus que infecta bacterias (bacteriófago). Este virus puede integrarse en el genoma bacteriano y al transferirse a otra célula puede llevar parte del genoma de esta bacteria y así transferir genes, entre ellos genes de resistencia antimicrobiana⁴².

2.3.4 Mecanismo de resistencia de *Staphylococcus aureus* a antimicrobianos

La resistencia presente en *S. aureus* es producto del intercambio de determinantes de resistencia como son los plásmidos y transposones^{43,44}. (Tabla 3)

En este microorganismo existen tres tipos de plásmidos: Los plásmidos tipo I que son los plásmidos más pequeños que contienen solo un determinante resistente a los antibióticos. Los plásmidos tipo II cuyos tamaños son intermedios los cuales contienen el gen de la β -lactamasa. El más grande son los plásmidos tipo III que contienen múltiples determinantes resistentes como la gentamicina, trimetoprima y resistencia al bromuro de etidio⁴³.

Además los transposones pueden proporcionar resistencia a aminoglucósidos, eritromicina, espectinomicina, tetraciclina, trimetoprima, vancomicina o β -lactámicos⁴⁴.

a.- Resistencia a la Penicilina:

La resistencia a la penicilina está mediada por la expresión del gen *blaZ* que se encuentra en el plásmido o transposón, el cual codifica la enzima β -lactamasa que actúa hidrolizando el anillo β -lactámico, de tal manera que el antibiótico queda inactivado⁴³.

En ausencia de antibiótico β -lactámico, el gen *BlaI* se une a la región promotora-operadora reprimiendo al gen *blaZ*, por lo que no se produce la transcripción de *blaZ*. En presencia del antibiótico β -lactámico, este se une a *BlaRI* que es un transductor de señal que detecta β -lactama, estimulando la activación autocatalítica de *BlaR1*, lo que conllevaría a que *BlaI* se divida en fragmentos inactivos, permitiendo la

transcripción de *blaZ* y *blaR1-blaI*. De esta manera, en presencia de β -lactama, *blaZ* se transcribe a β -lactamasa permitiendo que el *S. aureus* crezca inactivando β -lactama⁴³.

b.- Resistencia a la meticilina y oxacilina

La resistencia a la meticilina, la oxacilina y la nafcilina son consideradas β -lactámicos insensibles a la β -lactamasa semisintética, esta resistencia se ha desarrollado mediante la adquisición del gen *mecA*. *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA) no solo es resistente a la meticilina, sino que también es resistente a todos los β -lactámicos⁴³.

El gen *mec* esta regulada por *mec I* y *mec RI* que son reguladores propios. En ausencia del antibiótico β -lactámico, *Mec I* se une a la región promotora-operadora reprimiendo a *mecA* y *mec I*- *mec RI*; por lo que no se produciría la transcripción de *Mec A*. En cambio, cuando esta presente el antibiótico β -lactámico, este se uniría a *MecRI* que es un transductor de señal que detecta al β -lactama. Luego, el dominio de metaloproteasa de *MecRI* se coloca en el sitio citoplasmático logrando separar y escindir a *MecI*. De esta manera, *mecA* se transcribe a PBP2a, cuya afinidad es baja a β -lactámicos. Esta afinidad reducida por parte de los PBP2a se debería a que la serina del sitio activo de la transpeptidasa de la PBP2a se encuentra en una posición profunda por lo que sería inaccesible para los β -lactámicos⁴⁴.

c.- Resistencia a las Fluoroquinolonas

La resistencia ocurre debido a una adquisición gradual de mutaciones cromosómicas, principalmente a nivel de la subunidad *ParC* de la topoisomerasa IV y la subunidad *GyrA* del ADN girasa. Producto de los cambios de aminoácidos en las regiones críticas del complejo enzima-ADN (región determinante de la resistencia a las quinolonas [QRDR]) se reduce la afinidad de las quinolonas por estos dos objetivos: topoisomerasa IV y ADN girasa⁴⁵.

En cuanto a la resistencia a las fluoroquinolonas, se debería a una sobreexpresión de las bombas de eflujo multiresistente *NorA*, *NorB* y *NorC*. Donde la *NorA* expulsa a las moléculas hidrófilas norfloxacin y ciprofloxacino, mientras que la *NorB* y *NorC* actúan sobre farmacos hidrofóbicos como la esparfloxacina y la moxifloxacina⁴⁵.

d.- Resistencia a la Vancomicina

Se ha identificado dos formas de resistencia a la vancomicina. Las cepas VISA (vancomicina *S. aureus* con resistencia intermedia) heteroresistentes siguen siendo susceptibles a la vancomicina pero contienen subpoblaciones resistentes. Esta resistencia se debería a un engrosamiento de la pared celular, dado que hay una síntesis adicional de peptidoglicano con un mayor número de residuos de D-Ala-D-Ala, lo cual provocaría que la vancomicina se una a estos residuos y quede atrapada, entonces la vancomicina unida actúa como un impedimento adicional para que las moléculas del fármaco alcancen su objetivo que es el Lípido II el cual se encuentra en la membrana plasmática⁴⁵.

Tabla 3. Genes de resistencia y elemento genéticos móviles presentes en *S. aureus*

Tipo de elemento genético móvil	Vector	Antibiótico - gen de resistencia	Antibiótico objetivo
Plásmido	pC221, pC223, pUB112, pC194	cat	Cloranfenicol
	pUB110, pSK41, pKKS825, pGO1	aadD	Kanamicina, neomicina, paromomicina, tobramicina
	pMW2, pSAS, pl147, pl258	blaZ	Penicilina (Antibiótico β -lactámicos)
	pSK1, pSK16	dfrA	Trimetoprima
	pl258	ermB	Resistencia MLSB (macrólidos: eritromicina; lincosamidas: clindamicina, estreptogramina B)
	pE194, pUSA03	ermC	Resistencia MLSB (macrólidos: eritromicina; lincosamidas: clindamicina, estreptogramina B)
	pUB101	fusB	Ácido fusídico
	pSCFS1	isaB	Clindamicina
	SAP049A	aadE	Aminoglucósidos
	SAP049A	aphA	Neomicina y kanamicina
	pMG1	ileS-2	Mupirocina
	pT181, pUSA02	tetK	Tetraciclinas
Transposones	Tn4001	aacA-aphD	Gentamicina, kanamicina, tobramicina
	Tn552	blaZ	Antibióticos β -lactámicos
	Tn554	ermA	Resistencia MLSB (macrólidos: eritromicina; lincosamidas: clindamicina, estreptogramina B)
	Tn551	ermB	Resistencia MLSB (macrólidos: eritromicina; lincosamidas: clindamicina, estreptogramina B)
Elementos conjugativos integrativos	Tn5801	tetM	Tetraciclina
	Tn1546	VanA	Vancomicina
	Tn4001	aac60'-aph2"	Aminoglucósidos
Islas de patogenicidad de <i>S. aureus</i>	SaPIj50	bla	Penicilina (Antibiótico β -lactámicos)
	SaPI122	mdr	Proteína exportadora de multidrogas
	SaRIlfusB	fusB	Ácido fusídico

Adaptado por Habber et al ⁴⁴

2.3.5 Mecanismo de resistencia de *Listeria monocytogenes* a antimicrobianos

El principal mecanismo responsable del desarrollo a la resistencia a los antibióticos es a través de la adquisición de elementos móviles como los plásmidos autotransferibles y los transposones conjugativos. Sin embargo, también se sugiere que las bombas de eflujo están vinculadas con la resistencia a la fluoroquinolona, macrólido y cefotaxima⁴⁶.

A.- Mediada por conjugación

Según las investigaciones, la resistencia a la tetraciclina en *L. monocytogenes* se debe principalmente a los plásmidos conjugativos y transposones originados de *Enterococcus* o *Streptococcus*, donde los genes de resistencia implicados son tetS, tetM y tetL. Cabe recordar que el proceso de conjugación incluye: contacto directo de célula a célula, formación de pares de apareamiento y transferencia de ADN plasmídico a través de un pili conjugativo. Además se menciona que la adquisición del material genético móvil tiene lugar en el tracto gastrointestinal de los humanos⁴⁶.

B.- Mediadas por bombas de expulsión

La *L. monocytogenes* presenta tres bombas de expulsión, donde la primera denominada “MdrL” se encarga de extruir a antibióticos (macrólidos y cefotaxima), metales pesados y bromuro de etidio; la segunda bomba “Lde” está asociada con la resistencia a la fluoroquinolona y parcialmente a la acridina y al bromuro de etidio. La tercera bomba estaría relacionada con la resistencia a la fluoroquinolona^{46,47}.

2.3.6 Principales causas que favorecen la aparición y propagación de la resistencia

Las causas que favorecen la resistencia antimicrobiana se deben a causas humanas y microbianas^{48,49}.

Causas humanas

De acuerdo al estudio realizado por Chokshi et al, los principales factores socioeconómico y políticos que contribuyen a la resistencia a los antibióticos son distintos para los países en vías de desarrollo y en países desarrollados⁴⁸.

En países en vías de desarrollo⁴⁸:

- Falta de vigilancia del desarrollo de resistencia. En la mayoría de países en desarrollo hay poca o ninguna vigilancia de este tipo.
- Mala calidad de los antibióticos disponibles. Se ha demostrado que el uso de antibióticos pediátricos vencidos condujo a mayores tasas de resistencia en comparación con los medicamentos no vencidos. Las altas temperaturas, la luz solar intensa y la humedad pueden conducir a la degradación de los antibióticos afectando su calidad. Los medicamentos falsificados, en los que hay poco o ningún ingrediente activo, también se venden y pueden conducir a un aumento en el desarrollo de resistencia a los medicamentos.
- Mal uso clínico de antibióticos. El diagnóstico clínico erróneo y el uso indebido de antibióticos también contribuyen a la resistencia a los antibióticos debido al uso excesivo de antibióticos cuando no está clínicamente indicado. Este hecho es reforzado por la falta de métodos de diagnóstico adecuados.
- Facilidad de disponibilidad de antibióticos. En la mayoría de los países en desarrollo, existe poca regulación sobre la venta minorista de productos farmacéuticos. La facilidad de disponibilidad de antibióticos es probablemente uno de los mayores contribuyentes a la resistencia a los antibióticos.

En países desarrollados⁴⁸:

- Mala regulación del uso de antibióticos en el hospital. El uso excesivo de antibióticos junto con la estrecha interacción entre pacientes y la necesidad de aumentar la higiene y el saneamiento en los hospitales juegan un papel importante en el desarrollo y la transmisión de infecciones bacterianas resistentes a los medicamentos.
- Uso excesivo de antibióticos en animales productores de alimentos. En este caso los antibióticos no solo se usan para tratar enfermedades en animales, sino también de manera profiláctica para prevenir infecciones y no terapéuticamente para aumentar el crecimiento animal.

En países en desarrollo y desarrollados⁴⁸:

- Falta de investigación sobre nuevos antibióticos. La falta de incentivos económicos y obstáculos regulatorios son las principales fuerzas impulsoras detrás de la falta de nuevos antibióticos actualmente.

En forma de resumen, en un estudio se plantea los principales factores impulsores de la resistencia antimicrobiana en relación a las causas humanas⁵⁰. (Tabla 4)

Tabla 4: Factores identificados como impulsores de la resistencia antimicrobiana

Factores	Traducción en lenguaje sencillo
Mal uso / exceso de antimicrobianos humanos	Uso indebido y / o uso excesivo de antibióticos en humanos (por ejemplo, no terminar un ciclo de antibióticos, tomar antibióticos para infecciones virales, en lugar de bacterianas)
Uso / abuso excesivo de antimicrobianos en animales	Uso indebido y / o uso excesivo de antibióticos en animales (por ejemplo, agricultura)
Contaminación ambiental (incluyendo aguas residuales y metales pesados)	Productos de desecho de antibióticos que ingresan al medio ambiente (a través de la fabricación, alcantarillado y eliminación)
Transmisión de asistencia sanitaria	Bacterias resistentes que se transmiten entre las personas en el hospital y otras áreas de atención médica.
Diagnóstico rápido subóptimo	Falta de pruebas rápidas y precisas para diagnosticar infecciones
Medicina preventiva subóptima / vacunación	La falta de vacunas efectivas y la mala absorción de las existentes.
Dosificación subóptima, incluso de medicamentos subestándar y falsificados	Dosificación incorrecta de antibióticos en humanos (por ejemplo, no ajustar la dosis para el peso corporal)
Viaje	Los humanos viajan de un área del globo a otra, propagando insectos resistentes
Administración masiva de medicamentos en salud humana	Administración masiva de medicamentos: es decir, la administración regular de antibióticos a un gran grupo de personas (por ejemplo, todo un estado o país) para tratar una infección, independientemente de si las personas están enfermas o no

Adaptado de Castro et al⁵⁰

2.3.7 Consecuencias de la resistencia antimicrobiana transmitida por alimentos

A.- Los microorganismos que resisten a los antimicrobianos asociados con animales pueden ser patógenos para los humanos.

B.- Las bacterias resistentes a los antibióticos pueden transmitirse fácilmente a los humanos a través de los alimentos de los animales de granja.

C.- Estas bacterias resistentes a los antibióticos pueden propagarse al medio ambiente a través de desechos animales haciendo una difusión más amplia.

D.- Las bacterias pueden transmitir sus genotipos de resistencia a patógenos humanos no asociados con los animales a través de mecanismos de transferencia de elementos genéticos⁵⁰.

2.3.8 Consideraciones para la selección de los discos de sensibilidad antibiótica

De acuerdo al documento M100-S28 del CLSI⁵¹, los criterios establecidos para seleccionar los antimicrobianos en la prueba de sensibilidad son los siguientes:

- Agentes con eficacia clínica que muestren resultados aceptables en pruebas *in vitro*.
- Prevalencia de resistencia.
- Aparición mínima de resistencia.
- Costo.
- Indicaciones de la FDA.
- Consenso actual para el uso de drogas de primera elección y alternativas.

2.4 Biopelículas

2.4.1 Definición

Una biopelícula o 'Biofilm' es una comunidad microbiana sésil, compuesta de células adheridas a un sustrato de manera irreversible, incrustada en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares producidas por sí mismas⁵².

2.4.2 Composición y estructura

Estas estructuras que se organizan en forma de colonias adheridas a diferentes superficies, ya sean blandas, animadas e inanimadas, están formadas por un 15-25% de células y un 75-85% de agua y matriz extracelular, generalmente polisacáridos (segregados por las bacterias) aunque puede contener proteínas (<1-2%), ácidos nucleicos (ADN y ARN <1%), restos de plaquetas, fibrina y calcio⁵³.

El biofilm estructuralmente está constituido por tres componentes: la masa de células la cual puede estar formada por una sola especie o por múltiples especies microbiológicas, los espacios intercelulares o canales los cuales se han comparado con el sistema circulatorio de organismos superiores y la matriz extracelular que lo rodea compuesta por una mezcla de exopolisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y otras sustancias⁵³.

Mediante el empleo de la microscopia se han propuestos distintos modelos que adoptan estas estructuras⁵³.

A.- Modelo de monocapa

Se caracteriza por ser un modelo continuo, que describe a los biofilms como lisos, planos y homogéneos. Además, indica que la actividad química de los biofilms está basada en la difusión, los efectos físicos del flujo, la presión y el flujo de desprendimiento en sistemas de distribución de agua⁵⁴.

B.-Modelo tridimensional o multicapa

B.1 Modelo de Champiñón o tulipán

Este modelo representa la teoría actual sobre la estructura del biofilm. Esta conformación logro visualizarse gracias al empleo de la microscopia de barrido

confocal, la cual evidencio una estructura de champiñón o tulipán con torres, pedestales y canales de agua. La estructura superior del biofilm tiene forma de tallo delgado, atravesado por canales de agua. Las torres contienen estelas, las cuales pueden romperse y liberar células que colonizan nuevas superficies⁵⁴. (Ver Figura 3) Así mismo, los canales de agua permiten la dispersión e intercambio de moléculas orgánicas, cationes metálicos y metabolitos⁵⁴.

Cabe resaltar que este modelo propone un crecimiento rápido de la célula en la periferia del biofilm, y un crecimiento lento en el interior. Donde los microorganismos en el interior del biofilm pueden competir, operar independientemente, cooperar o ser depredadores. Los nutrientes quedan atrapados y se concentran en la matriz del biofilm, transportándose a través de ella mediante difusión. Por último, este modelo ha demostrado que el rango de la porosidad de los biofilms maduros en la parte superior es de 89% y de 5% en la capa inferior^{54,55}.

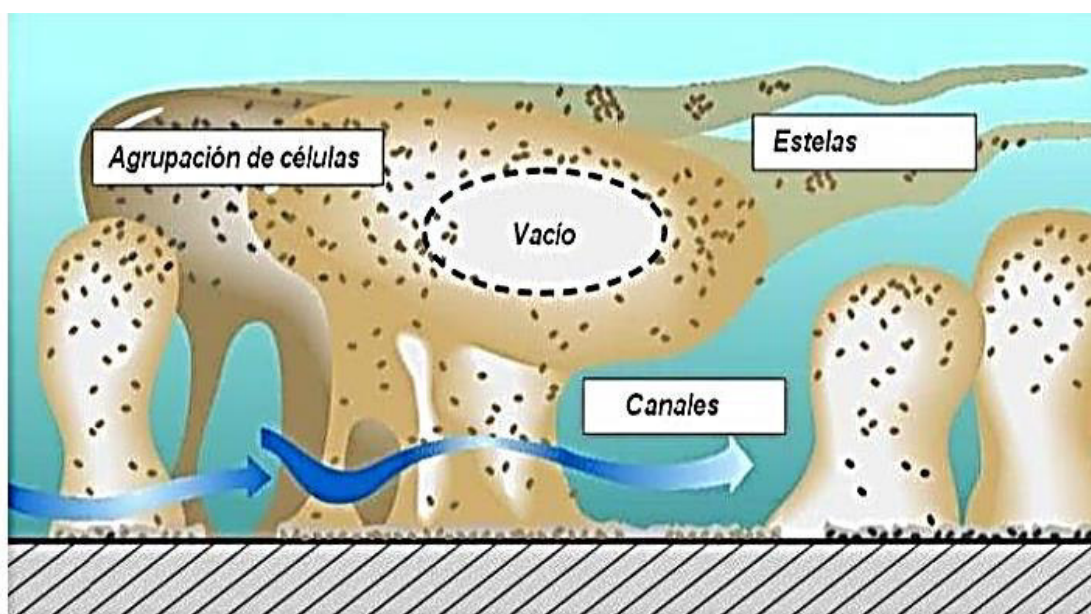


Figura 3. Modelo estructural actual de champiñón o tulipán

Recuperado de Stewart and Franklin ⁵⁵

2.4.3 Etapas de desarrollo

La formación de la biopelícula resulta de un proceso continuo, que comienza con la adhesión bacteriana a una superficie hasta el desarrollo de una estructura compleja y el desprendimiento de la misma^{53,56}.

Este proceso de formación de biopelícula se puede dividir en 5 etapas:

A.- Adhesión inicial reversible

La adhesión reversible o primaria puede ser:

- Activa: El transporte de las células libres (forma planctónica) hacia la superficie depende de la motilidad bacteriana otorgada por flagelos, fimbrias y pilis tipo IV.
- Pasiva: El transporte depende de factores externos como la gravedad, difusión, precipitación de partículas y dinámica de fluidos^{53,56}.

B.- Adhesión irreversible

El cambio de una adhesión reversible a una irreversible se produce por un cambio de una interacción débil por un enlace permanente el cual está mediado por polímeros y apéndices extracelulares^{53,56}.

C.- Formación de microcolonias

Simultáneamente con la producción de las sustancias poliméricas extracelular o exopolisacáridos (SPE o EPS), la acumulación y el crecimiento de los microorganismos adheridos conduce a la formación de microcolonias donde el enlace entre bacterias y sustrato se fortalece y se vuelve estable. Dicha acumulación estimula el ingreso de células planctónicas del medio circundante como resultado de la comunicación célula a célula (quorum sensing)⁵³.

D.- Maduración tridimensional de la estructura

Los microorganismos una vez adheridos empiezan a segregar exopolisacáridos, además la maduración implica el desarrollo de un ecosistema altamente organizado y de una estructura tridimensional que puede ser plana o en forma de hongo⁵⁶.

Asimismo, en esta se da la formación de canales, poros y redistribución de bacterias en el sustrato. Se sabe que la maduración se alcanza cuando existe disponibilidad de nutrientes, el ingreso de estos dentro de la biopelícula y la eliminación de residuos. Otros factores que intervienen son el pH interno, la penetración del oxígeno, fuentes de carbono y la osmolaridad^{53,56}.

E.- Desprendimiento del microorganismo o dispersión

En esta etapa las células sésiles pueden volver a sus formas planctónicas, las causas de esta disgregación pueden ser: (a) perturbación externa, tal como el aumento de la cizalladura del fluido; (b) procesos internos de biofilm, tales como degradación enzimática endógena; (c) liberación de exopolisacáridos o proteína de unión a la superficie; (d) el hambre y la necesidad de buscar nuevos ambientes ricos en nutrientes. Independientemente de la causa que impulsa el desprendimiento, esta dispersión puede definirse como un proceso activo que permite la colonización de nuevos nichos por parte de las células liberadas^{53,56}.

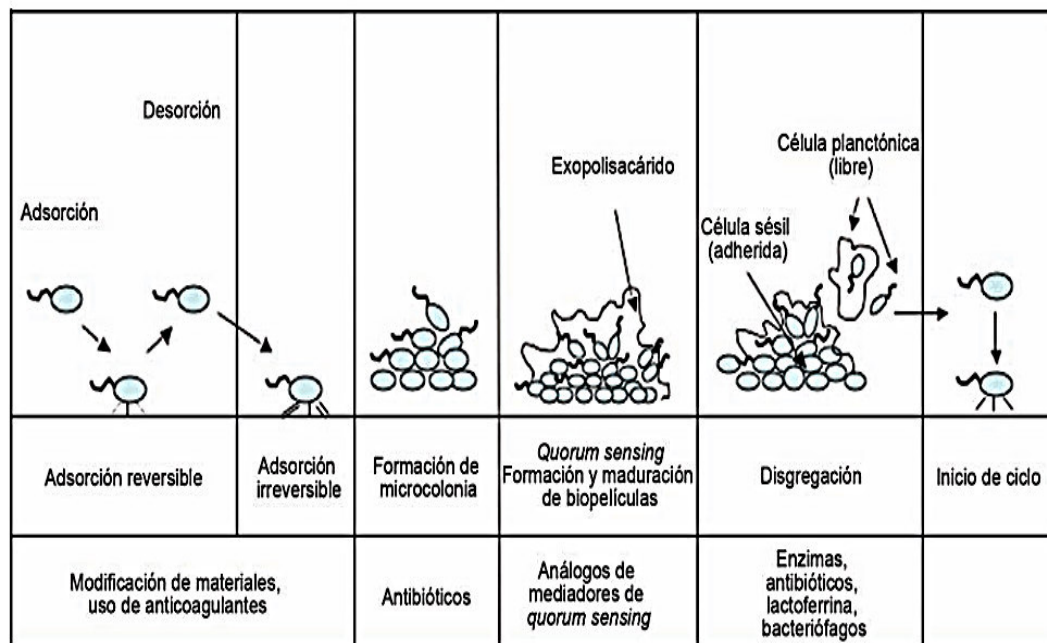


Figura 4. Fases de formación de biopelículas y estrategias de dispersión
Recuperado de Castrillon et al⁵⁷

2.4.4 Propiedades

a.- Heterogeneidad fisiológica: Es decir que en una misma biopelícula las bacterias pueden tener micronichos muy diferentes respecto al contenido de nutrientes del medio, tensión de oxígeno, dióxido de carbono, pH, etc. Así mismo, se puede encontrar células con estados y necesidades fisiológicas diferentes⁵⁸.

b.- Fenotipos en la biopelícula: El fenotipo es diferentes de aquellas bacterias que crecen dentro de las biopelículas con respecto a aquellas que crecen de forma planctónica. Además, las bacterias que se desarrollan en la biopelícula presentan resistencia a agentes externos como antibacterianos y desinfectantes y es este fenotipo el que se mantiene aun cuando las bacterias sésiles se desprenden de la biopelícula⁵⁸.

c.- Quorum sensing: Es un tipo de comunicación de célula a célula, la cual es un considerado un mecanismo muy importante de supervivencia ya que les permite actuar de forma colectiva⁵⁸.

d.- Capacidad adaptativa: Es decir, hay un balance entre el crecimiento y el mantenimiento de la estructura de la biopelícula cuando hay condiciones favorables de aportes de nutrientes y un adecuado medio ambiente. Sin embargo, en condiciones adversas la biopelícula tiene la capacidad de involucionar a estadios anteriores, pero vuelve a desarrollarse cuando las condiciones mejoran⁵⁸.

e.- Resistencia frente a antimicrobianos: Esta resistencia puede deberse a varias circunstancias: la protección que la matriz de exopolisacáridos proporciona a las bacterias; la menor concentración –no efectiva– con la que los antimicrobianos llegan a las zonas profundas del biofilm; la capacidad de las bacterias atacadas con dosis subletales para desarrollar resistencia frente a los antimicrobianos; la activación de genes que proporcionan mayor resistencia frente a los antimicrobianos por las bacterias que crecen en forma sésil en comparación con las formas planctónicas; el estado de quiescencia de las bacterias de zonas profundas del biofilm, debido al menor aporte de nutrientes, que las hace menos susceptibles a la acción de los antimicrobianos⁵⁸.

2.4.5 Biopelículas en la industria de alimentos

La presencia de biopelículas en una fábrica de alimentos pone en riesgo la salud humana y el riesgo va a depender de las especies bacterianas que forman dicha biopelícula. Los principales microorganismos relacionados con la formación de biopelículas son *Bacillus cereus* (el cual secreta toxinas que pueden causar diarrea y vómitos), *Escherichia coli* (las cuales pueden ser cepas enterotoxigénicas e incluso

enterohemorrágicas), *Listeria monocytogenes* (una especie ubicua en el suelo y agua que puede conducir al aborto en mujeres embarazadas y otras complicaciones graves en niños y ancianos), *Salmonella* entérica (que, al contaminar una biopelícula de una tubería de alimentos, puede inducir brotes masivos e incluso la muerte en niños y ancianos), y *Staphylococcus aureus* (conocido por su numerosas toxinas entéricas)⁵³. Las principales ubicaciones para el desarrollo de las biopelículas van a depender del tipo de fábrica, y en general incluyen como reservorios el agua, la leche, placas pasteurizadoras, membranas de osmosis inversa, mesas, guantes, carcasas de animales, sitios de almacenamiento de las materias primas, material de embalaje y otros⁵⁹.

A.- En la industria de lácteos:

Los agentes causantes de la leche pasteurizada son las bacterias Gram positivas y las esporas termoresistentes, donde la presencia de estos microorganismos se debería a inadecuados tratamientos térmicos, métodos de limpieza y desinfección de superficies. Se ha encontrado en las últimas décadas que existe una contaminación con *Bacillus subtilis* en el transporte de la leche cruda desde las fincas productoras hasta las fábricas, además se ha reportado su presencia en las superficies post-pasteurización, así como en otros equipos implicados en el procesamiento lácteo⁵⁴. Además, se ha observado formación de depósitos en los intercambiadores de calor, lo cual promovería la adhesión de microorganismos a la superficie generándose bioincrustaciones⁶⁰.

B.- En la industria cárnica:

Las aves presentan como microflora a la *Salmonella sp*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* y *E. coli*. Estos microorganismos pueden atacar fuertemente a la piel como a los músculos de las aves, así como también a los equipos de procesamiento. La contaminación de carne en el ambiente de proceso puede ocurrir en cualquier estado, desde el sacrificio hasta el embalaje. Se ha reportado que las células de la biopelícula, podrían interactuar con proteínas (fibronectina, laminina y colágeno) de la carne y adherirse exitosamente a la superficie⁶⁰.

2.4.6 Métodos de cuantificación de biopelículas de *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*

Existe una diversidad de métodos experimentales para poder cuantificar las biopelículas y estos pueden ser directos e indirectos.

A.- Métodos indirectos

A.1 Remoción-conteo: Se basan en remover al microorganismo de la superficie para luego proceder a su conteo. Ejemplo: Recuento de placa estándar, sonicación.

A.2 Estimación: Determinan el número de microorganismo adheridos *in situ* midiendo algunas características propias de las bacterias en estudio. Ejemplo: Ensayo inmunoenzimático, ensayo biológico y ensayo de microplaca⁶¹

Además se puede determinar indirectamente utilizando un marcador proxy que infiere la cantidad de biopelícula. Los ejemplos de estos marcadores incluyen masa seca, contenido total de proteínas, ADN, ARN, polisacáridos o metabolitos⁶².

También otro método indirecto es mediante el uso de la Microbalanza de cristal de cuarzo (QCM) que permite una medición no destructiva de la acumulación de biopelículas en función del tiempo⁶².

B.- Métodos directos

Se basan en técnicas microscópicas, por ejemplo: Microscopia de luz, microscopia focal de escaneo láser, microscopia electrónica de transmisión y microscopia electrónica de barrido⁶³.

En general hay varios métodos disponibles para la detección de biopelículas bacterianas, ya sea en base a:

- (a) la acumulación de tinte / pigmentos que se unen a las cargas negativas presentes en la EPS, por ejemplo, violeta de cristal o safranina.
- (b) tintes que se unen al ADN por ejemplo: DAPI, Hoechst, SYTO9 o naranja de acridina
- (c) al cálculo de unidades formadoras de colonias (UFC)
- (d) detección de la actividad metabólica, por ejemplo: ATP, sal de tetrazolio MTT, resazurina (azul de Alamar)⁶³.

Otros métodos directos empleados son el conteo celular basado en flujo, el cual se caracteriza porque las células en cultivo líquido fluyen a través de aberturas estrechas y se miden a medida que pasan. Como ejemplo esta el conteo de Coulter y la citometría de flujo⁶².

Basados en microscopía de luz y fluorescencia, tenemos a la microscopía de escaneo laser confocal (CLSM), se caracteriza por ser una forma especializada de microscopía que produce imágenes nítidas de alta resolución de biopelículas en tres dimensiones⁶².

Existe métodos alternativos de cuantificación, el cual usa el marcaje radioactivo, se caracteriza por la unión de un isótopo a una molécula biológica, como timidina o glucosa, y la observación mediante microscopía, centelleo/contador de rayos gamma⁶².

Adicionalmente para un análisis mas profundo de las películas se emplea modelos matemáticos y programas informáticos, entre los programas de mejoramiento de imágenes se usa el programa ImageJ y como modelo matemático tenemos al COMSTAT, el cual puede medir el biovolumen, la cobertura del área de superficie, la distribución del espesor de la biopelícula, el grosor medio de la biopelícula, el volumen de la microcolonia, la dimensión fractal, el coeficiente de rugosidad, la distancia media y máxima, y la relación superficie/volumen de pilas tridimensionales de imágenes de biopelículas⁶².

3. METODOLOGÍA

3.1 Diseño

El presente trabajo fue un estudio de investigación descriptivo, transversal y prospectivo.

3.2 Materiales

3.2.1 Material biológico

- *Listeria monocytogenes* ATCC 15313
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Rhodococcus equi* ATCC 6939

3.2.2 Medios de cultivo

- Agua Peptonada al 0.1 %
- Agar Baird Parker - MERCK
- Agar DNasa – MERCK
- Agar Manitol Salado – MERCK
- Agar Mueller Hinton – MERCK
- Caldo One Broth-Listeria Base – OXOID
- Suplemento One Broth-Listeria Selective Supplement – OXOID
- Agar Base Listeria Selective (Oxford Formulation) – OXOID
- Suplemento Listeria Selective Supplement (Oxford Formulation) – OXOID
- Tryptic Soy Agar (TSA) - MERCK
- Brain Heart Infusion (BHI) – MERCK
- Tryptic Soy Broth (TSB) – MERCK
- Extracto de levadura - OXOID
- Agar SIM – MERCK
- Caldo púrpura de bromocresol (Ver Anexo 1)
- Caldo nitrato (Ver Anexo 2)
- L(+) - Ramnosa
- D(+) - Xilosa - MERCK
- Manitol – MERCK
- Glucosa – MERCK

- Maltosa – DIFCO LABORATORIES
- Sangre de carnero – ARES Perú
- Glicerina – Química Torres

3.2.3 Equipos

- Autoclave – ALP Model
- Estufa a 37° C – Incucell
- Estufa a 30° C – HV Ovens
- Balanza analítica – Sartorius
- Vortex – Scilogex
- Licuadora - Oster
- Microscopio óptico – Bausch & Lomb
- Cabina de bioseguridad - Telstar Bio II Advance
- Lector de Elisa Microplate Reader BIOBASE-EL10A

3.2.4 Reactivos

- Kit para Tinción Gram
- Solución salina fisiológica al 0.9%
- PBS (Ver Anexo 3)
- BaCl₂
- H₂SO₄
- Alcohol medicinal de 70°
- Aceite de inmersión
- Solución de cristal violeta al 0.1%
- Solución acuosa de peróxido de hidrógeno al 3%
- Solución de ácido sulfanílico en ácido acético (Ver ANEXO 2)
- Solución de α-naftol en ácido acético (Ver ANEXO 2)
- Zinc pulverizado

3.2.5 Otros materiales

- Micropipeta transferpette de 0.5 – 10 µL – BRAND
- Micropipeta transferpette de 100 – 1000 µL – BRAND
- Micropipeta de 5 - 50 µL – BRAND

- Placas petri descartables – EUROLAB
- Microplaca de poliestireno estériles
- Bolsas de polietileno
- Caja de poliestireno
- Pinzas estériles
- Frascos de 250 mL y 500 mL
- Asa de Drigalsky
- Asas de siembra de Kohle
- Tubos de ensayo de vidrio de 10 mL
- Probetas de 100 mL y 250 mL
- Matraces de 250 mL
- Pipetas estériles de 1, 5 y 10 mL
- Gradillas
- Viales de borosilicato
- Porta y cubre objetos
- Gradillas
- Mechero
- Algodón

3.3 Plan de muestreo y tamaño de la muestra

La recolección de las muestras se realizó en los distintos puntos de venta por cada mercado y se recolectó en las mismas condiciones en que fue vendida. Esto se realizó durante los meses de Febrero y Marzo del 2019. En total, 60 muestras se recolectaron, que correspondieron a 20 muestras de carne fresca (10 de pollo y 10 de cerdo) por cada mercado: La Parada, Mercado Central y Caquetá. La muestra representativa fue de 200 gramos por cada tipo de carne y que fueron obtenidas de 10 puntos de venta distintos por cada mercado.⁶⁴

3.4 Transporte de las muestras

Las muestras fueron colocadas en bolsas de polietileno y transportadas en una caja de poliestireno con hielo, para poder mantener la refrigeración de las muestras hacia el laboratorio, y luego fueron inmediatamente procesadas dentro de las 2 a 3 horas posteriores a la recolección.^{64, 65}

3.5 Lugar de ejecución

El estudio se realizó en el Laboratorio de Microbiología del Instituto de Química Biológica, Microbiología y Biotecnología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.6 Metodología de trabajo

3.6.1 *Staphylococcus aureus*

Para garantizar los resultados de las pruebas de identificación que se obtuvieron de las muestras, se trabajó en cada prueba con la bacteria de referencia *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, como control.

3.6.1.1 Aislamiento⁶⁶

• Preparación y dilución de las muestras⁶⁶

- La superficie externa de la bolsa de polietileno se desinfectó con alcohol de 70°.
- En condiciones asépticas, se pesaron 10 g de muestra de manera representativa y se agregó 90 mL de agua peptonada al 0,1%. Luego se homogenizó en la licuadora durante 2 minutos, siendo esta la primera dilución (10^{-1}).
- Después se realizó la segunda dilución (10^{-2}), para lo cual se midió 1 mL de la primera dilución y se agregó a un tubo con 9 mL de agua peptonada al 0,1%.
- De esta dilución, se prepararon las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} .

• Recuento de *Staphylococcus aureus*: En placas de agar Baird Parker⁶⁶

- Las diluciones de cada muestra se prepararon a 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} .
- Se preparó y solidificó el agar Baird Parker en placas petri.

- Se sembró 0,1 mL de cada dilución en la superficie del medio y se extendió con ayuda de una espátula de Drigalsky.
- Las placas se procedieron a incubar durante 48 horas a 37°C.
- Pasado dicho tiempo, se eligieron las placas que contienen entre 20 y 200 colonias y se contaron todas las colonias negras y brillantes, rodeadas de zonas claras.
- Las colonias que se sospecharon son *Staphylococcus aureus*, se seleccionaron para poder hacer las posteriores pruebas de identificación.

• **Conservación**⁶⁷

Las colonias aisladas de *Staphylococcus aureus* de cada placa se procedieron a conservar en caldo TSB con glicerol (10% v/v), y congelados a -20°C, para después realizar las pruebas de identificación.

3.6.1.2 Pruebas de identificación

• **Morfología microscópica**⁶⁸

Se determinó a través de la tinción Gram, observando cocos gram positivos en racimos.

• **Prueba de coagulasa**⁶⁶

- Las colonias sospechosas y que fueron conservadas anteriormente, se tomó 50 µL y se sembraron en 3 mL de caldo BHI y se incubaron durante 18 a 24 horas a 37°C.
- Luego, se transfirió 0,1 mL del cultivo a tubos de 10 x 75 mm, que contenían plasma de conejo (0,3 mL) y en Baño María se incubaron a 35 - 37°C.
- Después de 4 horas, se examinó cada tubo de incubación, y si el plasma ha perdido su fluidez o se encuentra un coágulo más o menos grande. Si la reacción fue negativa, se incubaron los tubos a temperatura de laboratorio y se volvieron a examinar después de 24 horas.
- Se observaron las reacciones de coagulasa a diferente intensidad: 1+, 2+, 3+, 4+.
- Un resultado positivo fue un coágulo formado de 3+ de intensidad.

- **Prueba de DNasa⁶⁹**

- Se prepararon las placas que contienen Agar DNA, donde se inoculó formando una banda de 2 cm en la superficie de la placa.
- Las placas se procedieron a incubar a 35 - 37°C durante 18-24 horas.
- Se agregó HCl 1N a cada placa como indicador, lo que causa la precipitación del ADN, donde se observó un halo claro cerca de la colonia, lo que se consideró como una reacción positiva, debido a una zona de hidrólisis del ADN.

- **Prueba de Manitol⁶⁹**

- Se prepararon las placas con Agar Manitol Salado, donde se sembró en la superficie de la placa la muestra por estría.
- Las placas se incubaron durante 18-24 horas a 35-37°C. Después de 24 horas, se visualizaron las colonias de color amarillo rodeadas de una zona de igual color.

3.6.1.3 Prueba de sensibilidad por el método de Kirby Bauer⁵¹

- **Preparación del estándar (0,5 Escala de Mc Farland)**

Como patrón de comparación, se utilizó una suspensión de BaSO₄ (0,5 Escala de Mc Farland) para estandarizar el inóculo, preparada de la siguiente manera: 0,5 mL de una solución de BaCl₂ 1% p/v se agregó a 99,5 mL de una solución de H₂SO₄ 1% v/v.

- **Preparación del inóculo**

- Con el microorganismo aislado de las muestras incubadas por 18-24 horas de una placa con agar TSA, se seleccionaron las colonias y se preparó una suspensión en solución salina al 0,9 %.
- Se ajustó la suspensión a 0,5 Escala de Mc Farland. A la vez, se realizó una suspensión con la bacteria de referencia *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

- **Inoculación de las placas**

- Un hisopo estéril se sumergió en la suspensión, después de 15 minutos al ajuste de la turbidez del inóculo.
- El hisopo se rotó muchas veces presionando de manera firme sobre la pared interior del tubo y sobre la superficie de la placa de agar Mueller Hinton se

inoculó, estriando en tres direcciones para una distribución homogénea del inóculo.

- La placa se procede a dejar secarlo a temperatura ambiente durante 5 minutos para eliminar el exceso de humedad sea absorbido, antes de colocar los discos.

• **Aplicación de los discos**

- Los discos de sensibilidad utilizados fueron: penicilina (10 unidades), gentamicina (10 µg), ciprofloxacino (5 µg), norfloxacino (10 µg), tetraciclina (30 µg), eritromicina (15 µg), clindamicina (2 µg), sulfametoxazol-trimetoprim (25 µg).
- Los discos individuales se colocaron sobre la superficie del agar con ayuda de una pinza estéril, presionando suavemente sobre cada disco asegurando un contacto completo con la superficie del agar.

• **Incubación**

- Las placas se incubaron a 35 °C después de los 15 minutos de la aplicación de los discos por un periodo de 24 horas.
- Después del tiempo de incubación, se examinó cada placa y se procedió a medir los diámetros de los halos de inhibición.

• **Lectura de las placas e interpretación de resultados**

- Se midieron los diámetros de los halos de inhibición usando una regla (que incluye el diámetro del disco). La parte posterior de la placa sobre un fondo negro con luz reflejada a unos centímetros se mantiene iluminada.
- Como punto final, se tomó el área donde no hay un crecimiento visible, que puede ser observado de manera visual, donde no incluya velo de crecimiento o colonias que puedan ser detectadas con mucha dificultad en el borde de la zona.
- Los diámetros de inhibición fueron interpretados basándose en los lineamientos según la Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI M100-S28). La sensibilidad de la cepa bacteriana fue reportada como sensible (S), intermedio (I) o resistente (R).

3.6.1.4 Prueba de capacidad de formación de biopelículas por el método de microtitulación en placa^{70,71}

El procedimiento para determinar la capacidad de formación de biopelículas fue el método de microtitulación en placa de poliestireno de 96 pocillos descrito por Avila-Novoa⁶³ con las recomendaciones dadas por Stepanovic.⁷¹

- Se sembró cada cepa de *Staphylococcus aureus* en 10 mL de Caldo TSB durante 24 horas a 37°C.
- Pasado el tiempo de incubación, se transfirió alícuotas del cultivo de Caldo TSB a un nuevo Caldo TSB hasta llevar a una suspensión bacteriana ajustada al patrón 0,5 de Mc. Farland, para cada cepa.
- Luego, de esta suspensión bacteriana ajustada, se realizó una dilución 1:100 en TSB con glucosa al 0,25%.
- Cada cepa, se evaluó por cuadruplicado en la placa de microtitulación con 200 µL de la suspensión bacteriana diluida.
- Se incluyeron cuatro pocillos de TSB con glucosa al 0,25% en cada placa como controles negativos.
- Luego, las microplacas se incubaron durante 24 horas a 37° C.
- Pasada la incubación, se aspiró el contenido de cada pocillo y se lavó tres veces con solución buffer fosfato salino estéril (PBS, pH 7,4). Luego, las placas se secaron a temperatura ambiente.
- Se agregaron 100 µL de solución de cristal violeta al 1 % manteniéndose a temperatura ambiente por 5 minutos, y posteriormente el exceso de tinción se enjuagó con agua destilada estéril.
- Las placas de microtitulación se secaron a temperatura ambiente.
- Seguido a esto, se agregó 150 µL de etanol al 95% para solubilizar el colorante adherido a las paredes.
- La densidad óptica (DO) se midió a 570 nm en un lector de Elisa Microplate Reader BIOBASE-EL10A. El valor de DO se considera proporcional a la formación de biomasa o cantidad de biofilm. Se incluyó como control positivo la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Determinación de la capacidad de formación de biopelículas

La capacidad de las cepas de *Staphylococcus aureus* de producir biopelícula se clasificó de acuerdo a la densidad óptica (DO) obtenida a 570 nm.

Las recomendaciones de Stepanovic⁷¹ se emplearon para definir el punto de corte (DOC) y la clasificación de las cepas. El DOC se definió como el promedio de las densidades ópticas obtenidas en los controles negativos más 3 desviaciones estándar.

La capacidad de formación de biopelícula de las cepas se clasificó en base a la DO y DOC; según la siguiente clasificación:

- Cepas no formadoras de biopelícula: $(DO) \leq DOC$
- Cepas formadoras débiles de biopelícula: $DOC < (DO) \leq 2 \times DOC$
- Cepas formadoras moderadas de biopelícula: $2 \times DOC < (DO) \leq 4 \times DOC$
- Cepas formadoras fuerte de biopelícula: $4 \times DOC < (DO)$

3.7.2 *Listeria monocytogenes*

Para garantizar los resultados de las pruebas de identificación que se obtuvieron de las muestras, se trabajó en cada prueba con la bacteria de referencia *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, como control.

3.7.2.1 Aislamiento²¹

• Primer Enriquecimiento

Se pesaron 25 gramos de muestra en 225 mL de caldo de enriquecimiento “One Broth-Listeria Base”, que contenía el suplemento selectivo “One Broth-Listeria Selective Supplement”. Posteriormente las muestras se incubaron durante 24 horas a 30 °C.

• Segundo Enriquecimiento

Después de 24 horas, 0,1 mL del caldo del primer enriquecimiento se llevó a un tubo de ensayo con 10 mL de caldo One Broth Listeria Base. Se llevó a incubación a 30 °C durante 24 horas.

- **Aislamiento Selectivo**

Después de 24 horas de incubación del primer enriquecimiento, de cada muestra se tomó una asada del caldo, y se sembró por estrías en agar Oxford. Posteriormente se incubaron a 35-37°C por 24 a 48 horas.

De la misma manera, a partir del paso del segundo enriquecimiento, una asada del caldo de cada muestra, se sembró por estrías en agar Oxford.

- **Conservación de las cepas**

Transcurrido este tiempo de incubación, se seleccionó de 4 a 5 colonias sospechosas y se sembró en agar TSA suplementado con 0,6% de extracto de levadura, incubándose a 30°C por 48 horas y se llevó a refrigeración para las posteriores pruebas de identificación bioquímica.

3.7.2.2 Pruebas de identificación²¹

Se procedió a realizar las siguientes pruebas, según lo recomendado en el Manual de Bacteriología Analítica 9na Edición.

- **Morfología microscópica**

Se determinó a través de la tinción Gram observando bacilos gram positivos.

- **Prueba de catalasa**

Se comprobó mediante la adición de H₂O₂ al 3%, y así se determina la presencia de la enzima catalasa.

- **Fermentación de carbohidratos**

Se tomó 50 µL de las cepas conservadas en TSB suplementado con extracto de levadura al 0,6 %, y se inoculó en tubos con Caldo Púrpura de Bromocresol al 0,5% de los siguientes carbohidratos: maltosa, ramnosa, glucosa, manitol y xilosa. Durante un período de 7 días, se incubó a 35 °C, observando cambio de color diariamente.

- **Reducción de nitratos**

Se sembró de las cepas conservadas en agar TSA suplementado con extracto de levadura al 0,6 % y se inoculó en Caldo Nitrato. Se incubó a 35 °C durante 5 días. Para la lectura, se adicionó 0,2 mL del Reactivo A (ácido sulfanílico en ácido acético) y 0,2 mL del Reactivo C (alfa-naftol en ácido acético). Si no se desarrolla color, se adiciona zinc en polvo y se espera por una hora. Un color naranja indica reducción del

nitrato, mientras que una coloración roja o rosada en el medio corresponde a la reacción negativa para *Listeria monocytogenes*.

- **Movilidad**

Se sembró por puntura en el medio SIM, a partir del agar TSA suplementado con extracto de levadura al 0,6 %. Luego, se incubó a temperatura ambiente (20-25 °C) por 7 días, para observar el patrón de movilidad dando la forma de paraguas.

- **Hemólisis**

A partir del agar TSA con extracto de levadura al 0,6 %, se sembró en agar sangre al 5%. Luego, se incubó a 35 °C durante 48 horas. Se observó el tipo de hemólisis.

- **Prueba de CAMP**

A partir del agar TSA con extracto de levadura al 0,6 %, se sembró en agar sangre al 5%, las cepas hemolíticas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Rhodococcus equi* ATCC 6939 en paralelo y diametralmente opuestas una de la otra. Varias cepas sospechosas paralelas unas de otras se sembraron, en ángulo recto, entre *S. aureus* y *R. equi*. Se incubó a 35 °C durante 24 a 48 horas. Se examinó la hemólisis y las cepas sospechosas de *Listeria monocytogenes* presentaron hemólisis pronunciada cerca de la zona de hemólisis de *S. aureus*.

3.7.2.3 Prueba de sensibilidad por el método de Kirby Bauer⁷⁸

- **Preparación del estándar a 0,5 de la escala de Mc Farland**

Se utilizó como patrón de comparación, una suspensión de BaSO₄ (0,5 de la escala de Mc Farland) para estandarizar la densidad del inóculo, preparada como sigue: 0,5 mL de una solución de BaCl₂ 1% p/v se agregó a 99,5 mL de una solución de H₂SO₄ 1% v/v en constante movimiento para mantener la suspensión.

- **Preparación del inóculo**

- Las cepas aisladas e identificadas se recuperaron en placas de agar TSA suplementado con 0,6 % de extracto de levadura, a 37°C por 48 horas.
- Después de la recuperación de las cepas, se transfirieron de tres a cinco colonias a una suspensión directa en solución salina al 0,85 %, para la obtención de una suspensión bacteriana que se ajustó inmediatamente a la

escala 0,5 de Mc Farland. Se realizó a la vez, una suspensión con la bacteria de referencia (*Listeria monocytogenes* ATCC 15313).

- **Inoculación de las placas**

- Una vez ajustada la turbidez del inóculo, se inocularon en las superficies secas de placas con agar de Muller-Hinton, con sangre al 5%, la cual se utilizó para evidenciar la hemólisis de las cepas encontradas de *Listeria monocytogenes*.

- **Aplicación de los discos**

- Los discos de sensibilidad utilizados fueron: ampicilina (10 µg), penicilina (10 µg), tetraciclina (30 µg), sulfametoxazol-trimetoprim (25 µg), gentamicina (10 µg), ciprofloxacino (5 µg), clindamicina (2 µg), eritromicina (15 µg) y vancomicina (30 µg).
- Los discos individuales se colocaron sobre la superficie del agar con ayuda de una pinza estéril, presionando suavemente sobre cada disco asegurando un contacto completo con la superficie del agar.

- **Incubación**

- Las placas se incubaron a 37°C durante 48 horas.
- Luego del tiempo de incubación, cada placa se examinó y se midieron los diámetros de los halos de inhibición de cada disco.

- **Lectura de las placas e interpretación de los resultados**

- Los diámetros de las zonas de inhibición se midieron, incluyendo el diámetro del disco, usando una regla.
- Los diámetros de inhibición fueron interpretados basándose en los lineamientos según la Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI M100-S28). La sensibilidad de la cepa bacteriana fue reportada como sensible (S), intermedio (I) o resistente (R).

3.7.2.4 Prueba de capacidad de formación de biopelículas por el método de microtitulación en placa⁶³

El procedimiento para determinar la capacidad de formación de biopelículas fue el método de microtitulación en placa de poliestireno de 96 pocillos descrito por Djordjevic⁶³.

- Cada cepa identificada se sembró en 10 mL de BHI durante 18 a 24 horas a 32 °C.
- Pasado el tiempo de incubación, se transfirió alícuotas del cultivo de caldo BHI a un nuevo caldo BHI hasta llevar a una suspensión bacteriana ajustada al patrón 0,5 de Mc. Farland, para cada cepa.
- Se transfirió 100 µL del caldo BHI a los pocillos de los extremos de la microplaca, que fueron los controles negativos.
- Se transfirió 100 µL del caldo BHI conteniendo las cepas identificadas de *Listeria monocytogenes* a escala 0,5 de Mc Farland, a cada pocillo de la microplaca, que se realizó por cuadruplicado.
- La microplaca de poliestireno se incubó a 32 °C durante 20 horas.
- Luego del tiempo de incubación, se removió el medio de cultivo de los pocillos y se lavó cinco veces la microplaca con agua estéril.
- Se dejaron secar las placas por 45 minutos y los pocillos se tiñeron con 150 µL de solución cristal violeta al 0,1% durante 45 minutos.
- Después de la tinción, se lavó nuevamente cinco veces la placa con agua estéril. Las biopelículas fueron visibles como anillos morados en las paredes y fondo de cada pocillo.
- El análisis cuantitativo se realizó agregando 200 µL de etanol al 95%, para solubilizar el colorante adherido a las paredes.
- La densidad óptica (DO) se midió a 595 nm en un lector de Elisa Microplate Reader BIOBASE-EL10A. El valor de la DO se considera proporcional a la formación de biomasa o cantidad de biofilm. Se incluyó como control positivo la cepa *Listeria monocytogenes* ATCC 15313.

Determinación de la capacidad de formación de biopelículas

La capacidad de las cepas de *Listeria monocytogenes* de producir biopelícula se clasificó de acuerdo a la densidad óptica (DO) obtenida a 595 nm.

Las recomendaciones de Stepanovic⁷¹ se emplearon para definir el punto de corte (DOC) y la clasificación de las cepas. El DOC se definió como el promedio de las densidades ópticas obtenidas en los controles negativos más 3 desviaciones

estándar. La capacidad de formación de biopelícula de las cepas se clasificó en base a la DO y DOC; según la siguiente clasificación:

- Cepas no formadoras de biopelícula: $(DO) \leq DOC$
- Cepas formadoras débiles de biopelícula: $DOC < (DO) \leq 2 \times DOC$
- Cepas formadoras moderadas de biopelícula: $2 \times DOC < (DO) \leq 4 \times DOC$
- Cepas formadoras fuerte de biopelícula: $4 \times DOC < (DO)$

Análisis estadístico

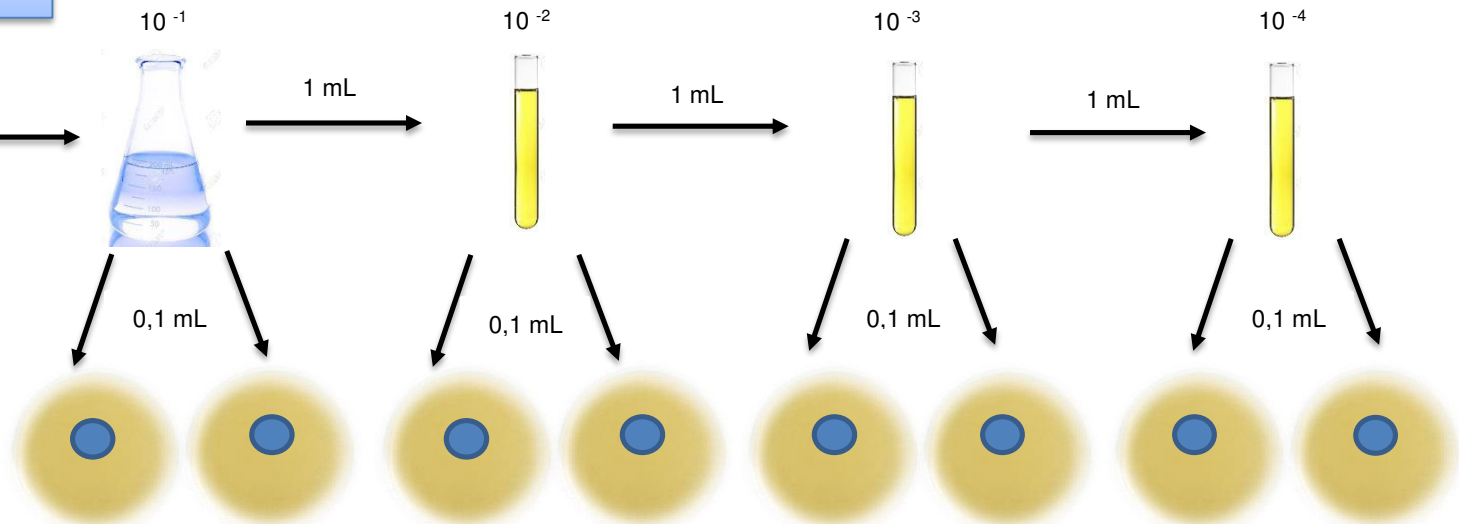
Se empleó el programa SPSS, para realizar un análisis estadístico de los datos obtenidos a través del uso de tablas, representaciones gráficas (como gráficos de barras y sectores), la media (medida de tendencia central) y desviación estándar (medida de dispersión).

Figura 5. Esquema para la determinación de *Staphylococcus aureus* en carnes frescas

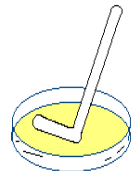
Pesar 10 g de muestra de condiciones de asepsia y homogenizar con 90 mL de agua peptonada al 0,1%



Realizar las diluciones decimales empleando tubos con 9 mL de agua peptonada al 0,1%



Depositar por duplicado 0,1 mL de cada dilución en placas petri con agar Baird Parker.



Distribuir la muestra con la espátula de Drigalski

Incubar a 37°C por 24-48 h



Contar las colonias brillantes, de color negro con halos transparentes

Incubar a 37°C por 24 h



Siembra de colonias típicas en tubos con caldo BHI y realizar las pruebas de Identificación

Pruebas de Identificación de *Staphylococcus aureus*

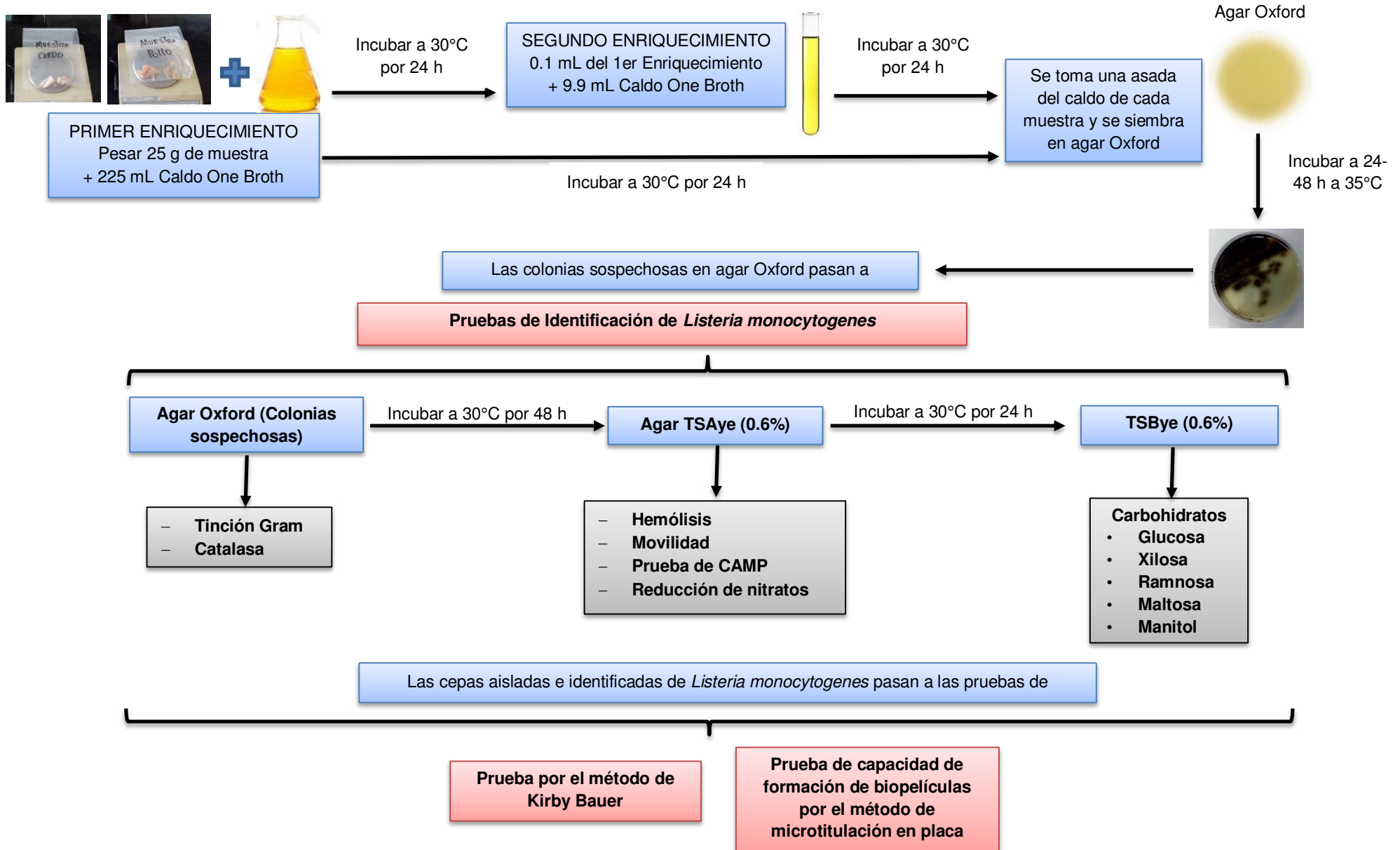
- Tinción Gram
- Prueba de coagulasa
- Prueba de DNasa
- Prueba de manitol

Las cepas aisladas e identificadas de *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo pasan a las pruebas de

Prueba por el método de Kirby Bauer

Prueba de capacidad de formación de biopelículas por el método de microtitulación en placa

Figura 6. Esquema para la determinación de *Listeria monocytogenes* en carnes frescas



4. RESULTADOS

4.1 Aislamiento e identificación de *Staphylococcus aureus* en carnes frescas

De las 60 muestras de carnes frescas analizadas procedentes de 3 mercados diferentes de Lima Metropolitana, se logró aislar *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva en 45 muestras expendidas (Figura 7), asimismo se presenta la incidencia por cada tipo de carne (Figura 8) y los recuentos del microorganismo mayores a 10^4 UFC/g. (Tabla 5)

De las 45 muestras positivas de carnes frescas, 13 muestras correspondieron al mercado Central (65,00%), 17 muestras al mercado Caquetá (85,00%) y 15 muestras del mercado La Parada (75,00%). (Figura 9)

En la Tabla 6, se observan las pruebas de identificación realizadas a las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de las muestras de carnes frescas de los 3 mercados de Lima Metropolitana. De las 47 cepas sospechosas, que fueron sometidas a las pruebas de identificación, solo dos cepas (C33 y C55) fueron negativas a las pruebas de coagulasa, DNasa y Manitol Salado. Por lo tanto, sólo se confirmaron 45 cepas de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva.

Figura 7. Porcentaje de muestras de carnes frescas positivas al aislamiento de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva (n = 60)

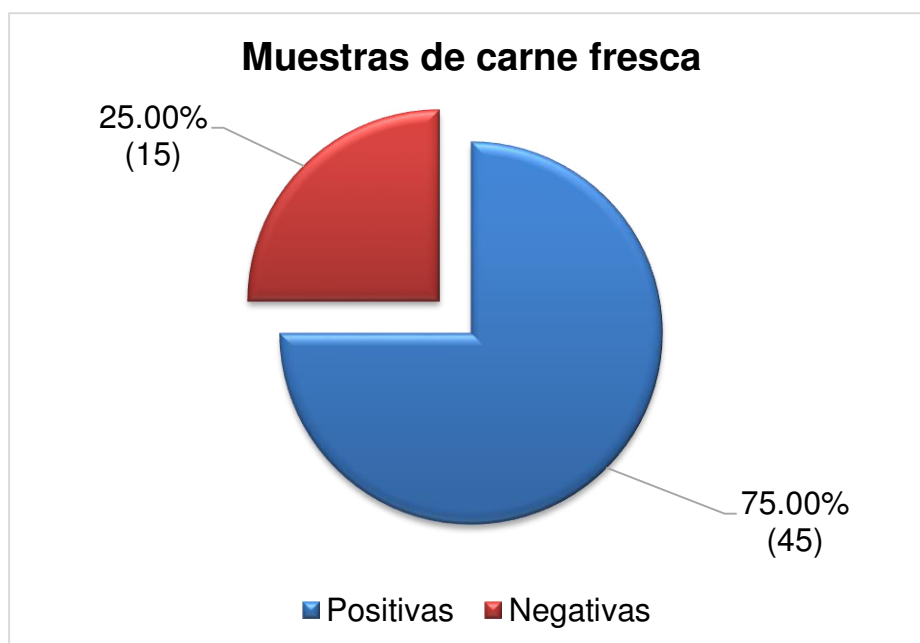


Figura 8. Porcentaje de muestras positivas al aislamiento de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva por cada tipo de carne fresca (n = 30)

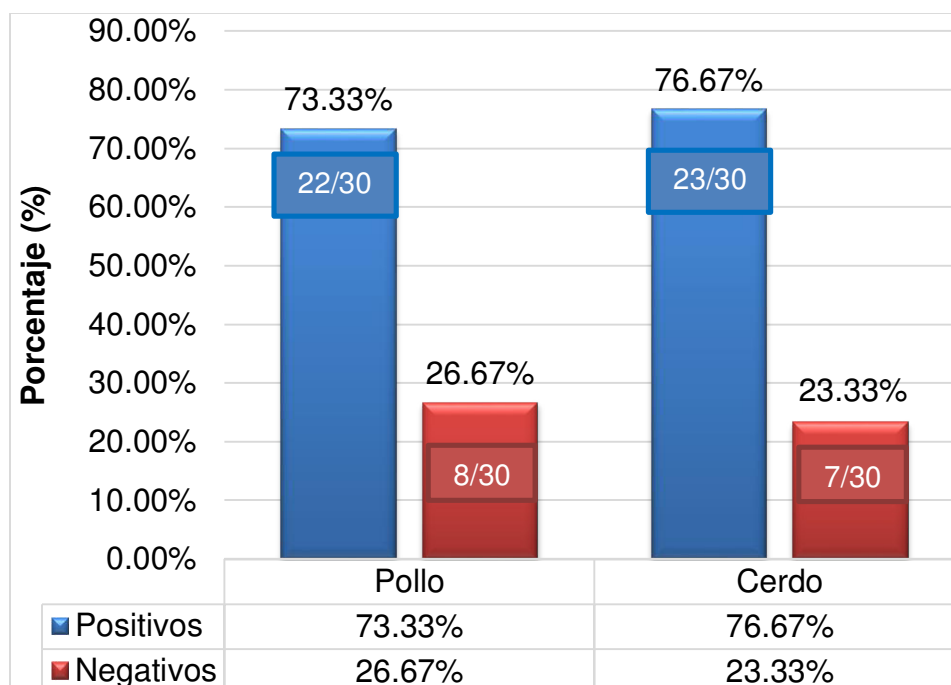


Figura 9. Porcentaje de resultados positivos y negativos al aislamiento de *S. aureus* coagulasa positiva en carnes frescas según el mercado de procedencia (n = 20)

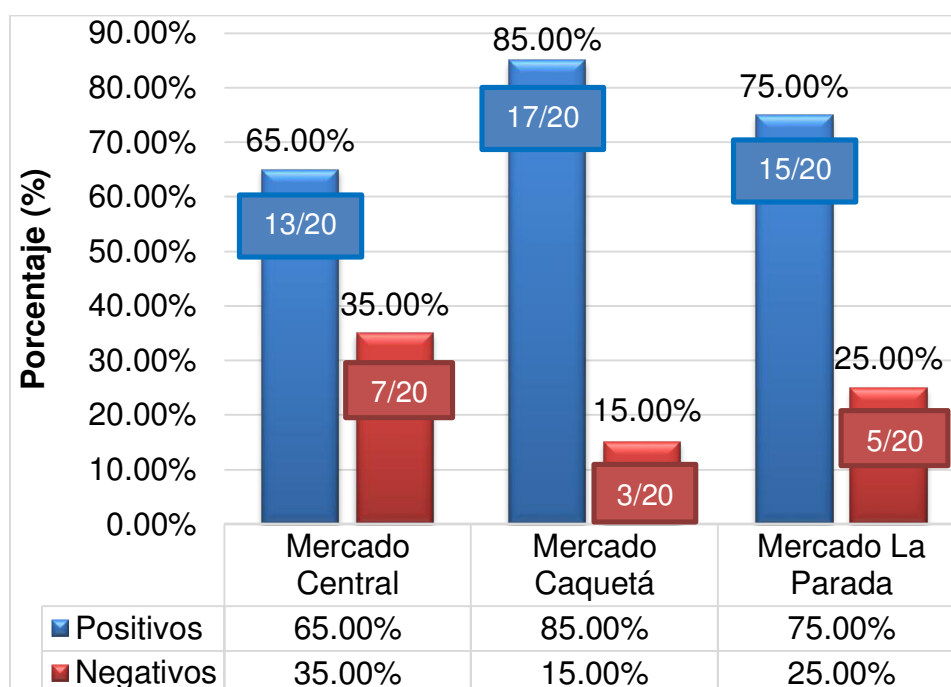


Tabla 5. Recuento de *Staphylococcus aureus* en carnes frescas en UFC/g

Mercados	Puntos de Venta	Tipo de Carne	Muestra	UFC/g
MERCADO CENTRAL (Cercado de Lima) 20 muestras	1	Pollo (P)	P1	33 x 10 ⁴
	2		P2	< 10
	3		P3	54 x 10 ⁴
	4		P4	< 10
	5		P5	< 10
	6		P6	36 x 10 ⁴
	7		P7	34 x 10 ⁴
	8		P8	45 x 10 ⁴
	9		P9	< 10
	10		P10	76 x 10 ⁴
	1	Cerdo (C)	C11	55 x 10 ⁴
	2		C12	49 x 10 ⁴
	3		C13	< 10
	4		C14	< 10
	5		C15	59 x 10 ⁴
	6		C16	31 x 10 ⁴
	7		C17	< 10
	8		C18	66 x 10 ⁴
	9		C19	41 x 10 ⁴
	10		C20	60 x 10 ⁴
MERCADO CAQUETÁ (San Martín de Porres) 20 muestras	1	Pollo (P)	P21	52 x 10 ⁴
	2		P22	46 x 10 ⁴
	3		P23	37 x 10 ⁴
	4		P24	39 x 10 ⁴
	5		P25	46 x 10 ⁴
	6		P26	36 x 10 ⁴
	7		P27	< 10
	8		P28	59 x 10 ⁴
	9		P29	55 x 10 ⁴
	10		P30	65 x 10 ⁴
	1	Cerdo (C)	C31	42 x 10 ⁴
	2		C32	51 x 10 ⁴
	3		C33	44 x 10 ⁴
	4		C34	69 x 10 ⁴
	5		C35	75 x 10 ⁴
	6		C36	38 x 10 ⁴
	7		C37	32 x 10 ⁴
	8		C38	< 10
	9		C39	55 x 10 ⁴
	10		C40	40 x 10 ⁴
MERCADO LA PARADA (La Victoria) 20 muestras	1	Pollo (P)	P41	47 x 10 ⁴
	2		P42	79 x 10 ⁴
	3		P43	< 10
	4		P44	< 10
	5		P45	53 x 10 ⁴
	6		P46	< 10
	7		P47	42 x 10 ⁴
	8		P48	39 x 10 ⁴
	9		P49	52 x 10 ⁴
	10		P50	48 x 10 ⁴
	1	Cerdo (C)	C51	62 x 10 ⁴
	2		C52	49 x 10 ⁴
	3		C53	35 x 10 ⁴
	4		C54	43 x 10 ⁴
	5		C55	56 x 10 ⁴
	6		C56	54 x 10 ⁴
	7		C57	61 x 10 ⁴
	8		C58	49 x 10 ⁴
	9		C59	< 10
	10		C60	35 x 10 ⁴
Leyenda: El recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> en las muestras resaltadas superan el valor de 10 ⁴ UFC/g.				

Tabla 6. Pruebas de identificación de cepas de *Staphylococcus aureus*

Mercados	Cepa Sospechosa	Prueba de Lecitinasa	Tinción de Gram	Prueba de Coagulasa	Prueba de DNAsa	Prueba de Manitol Salado	Presencia de <i>S. aureus</i>
MERCADO CENTRAL (Cercado de Lima) 13 muestras	P1	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
	P3	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
	P6	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
	P7	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
	P8	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
	P10	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
	C11	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
	C12	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
	C15	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
	C16	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
	C18	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
MERCADO CAQUETÁ (San Martín de Porres) 17 muestras	C19	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
	C20	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
	P21	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
	P22	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
	P23	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
	P24	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
	P25	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
	P26	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
	P28	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
	P29	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
	P30	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
	C31	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
	C32	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
	C33	+	+	-	-	-	<i>Staphylococcus spp.</i>
	C34	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
	C35	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
	C36	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
	C37	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
MERCADO LA PARADA (La Victoria) 15 muestras	C39	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
	C40	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
	P41	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
	P42	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
	P45	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
	P47	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
	P48	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
	P49	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
	P50	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
	C51	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
	C52	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
	C53	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
	C54	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
	C55	+	+	-	-	-	<i>Staphylococcus spp.</i>
	C56	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
	C57	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
	C58	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
	C60	+	+	+	+	+	<i>S. aureus</i>
<p>• Leyenda: (+) = Resultado positivo (-) = Resultado negativo</p>							

4.2 Prueba de sensibilidad por el método de Kirby Bauer de *Staphylococcus aureus*

En la Tabla 7, se observa la susceptibilidad de las cepas de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva a los antibióticos seleccionados, mediante la medición del diámetro del halo de inhibición, clasificándolas como resistente, sensible e intermedio de acuerdo a los lineamientos según la Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI M100-S28).

Se muestran en la Tabla 8 y la Figura 10, los porcentajes de resistencia de cepas de *S. aureus* coagulasa positiva, que es mayor para penicilina (75,56%) y tetraciclina (28,89%). También los porcentajes de sensibilidad a gentamicina (82,22%), ciprofloxacino (82,22%), norfloxacino (93,34%), clindamicina (77,78%) y sulfametoxazol-trimetoprim (97,78%). Además la sensibilidad intermedia que fue mayor para eritromicina (51,11%).

Tabla 7. Perfil de sensibilidad antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva

CEPA	Prueba de sensibilidad antimicrobiana							
	P10	CN10	CIP5	NOR10	TE30	E15	DA2	SXT25
P1	R	S	S	S	S	I	S	S
P3	S	S	S	S	I	I	S	S
P6	R	S	I	S	I	I	S	S
P7	R	S	I	S	I	R	I	S
P8	S	S	I	S	I	I	I	I
P10	R	S	S	S	I	S	S	S
C11	S	S	S	S	S	S	S	S
C12	R	R	R	S	S	R	R	S
C15	R	S	I	S	S	S	S	S
C16	R	S	S	S	S	S	S	S
C18	R	S	S	R	S	I	S	S
C19	R	S	I	S	I	I	S	S
C20	R	I	S	S	R	R	S	S
P21	R	S	S	S	S	I	R	S
P22	R	S	S	S	R	S	S	S
P23	R	S	S	S	R	S	S	S
P24	R	R	S	S	R	R	S	S
P25	R	S	S	S	S	S	S	S
P26	R	S	S	S	S	I	S	S
P28	R	S	S	S	S	I	I	S
P29	R	S	S	S	I	I	S	S
P30	R	S	S	S	I	I	S	S
C31	R	S	S	S	I	I	S	S
C32	R	S	I	S	I	I	S	S
C34	R	S	S	S	S	I	S	S
C35	R	S	I	S	S	I	S	S
C36	R	S	S	S	R	I	S	S
C37	R	R	S	S	R	R	S	S
C39	R	S	S	S	R	I	I	S
C40	R	R	S	S	R	R	S	S
P41	S	S	S	S	S	S	S	S
P42	S	S	S	S	S	I	S	S
P45	S	R	S	S	R	S	S	S
P47	S	S	S	S	S	S	S	S
P48	S	S	S	S	S	S	S	S
P49	R	R	S	S	R	R	S	S
P50	R	S	S	S	I	R	R	S
C51	R	S	S	S	R	I	S	S
C52	R	S	S	S	S	I	S	S
C53	R	S	S	I	S	S	I	S
C54	R	R	S	S	R	R	S	S
C56	S	S	S	I	I	I	I	S
C57	R	S	S	S	R	I	I	S
C58	S	S	S	S	S	I	S	S
C60	S	S	S	S	S	S	S	S

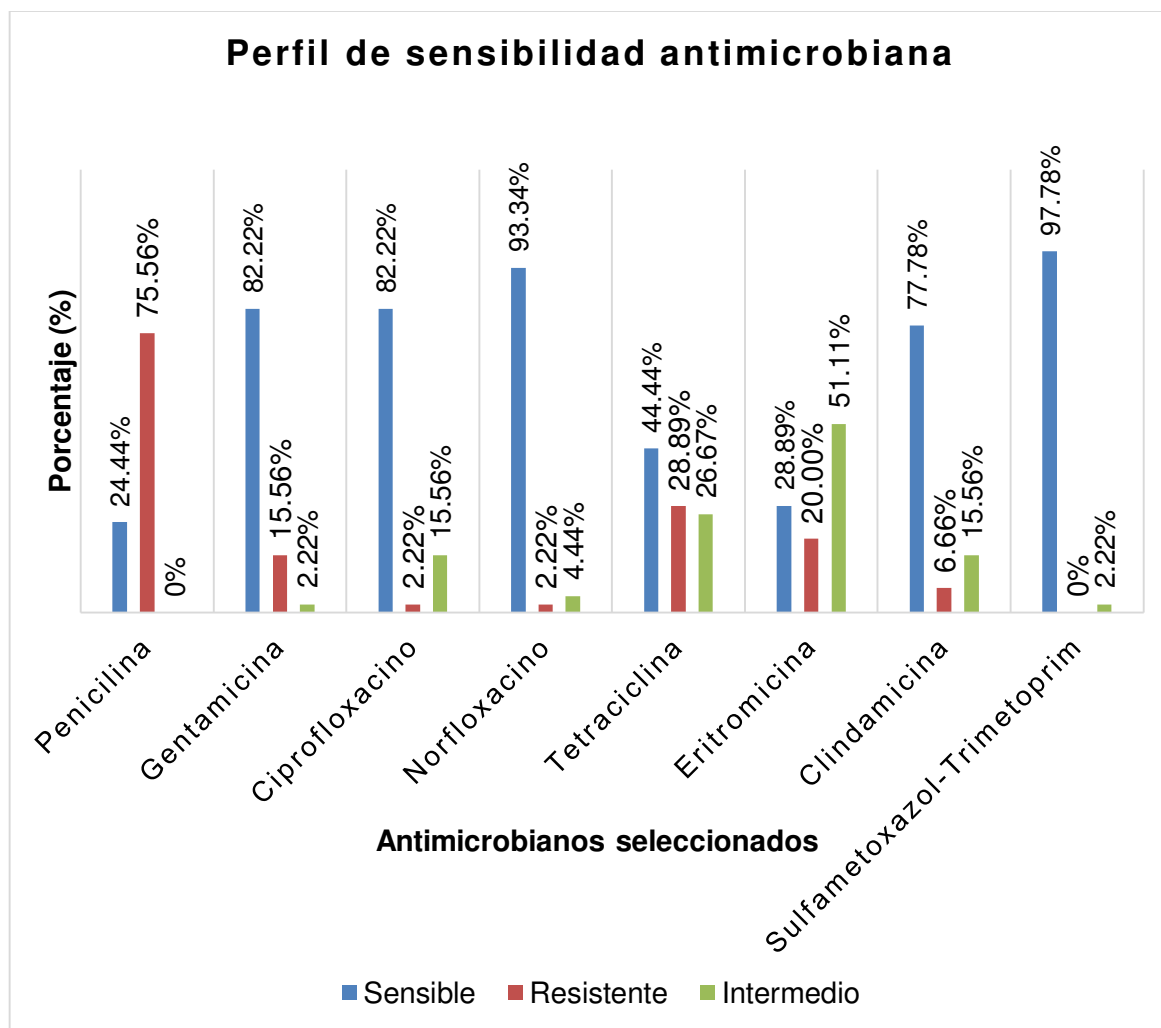
Tabla 7(continuación). Perfil de sensibilidad antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva

<ul style="list-style-type: none"> • Leyenda: R = Resistente S = Sensible I = Intermedio • Antimicrobianos: P10 = Penicilina (10 µg) CN10 = Gentamicina (10 µg) CIP5 = Ciprofloxacino (5 µg) NOR10 = Norfloxacino (10 µg) TE30 = Tetraciclina (30 µg) E15 = Eritromicina (15 µg) DA2 = Clindamicina (2 µg) SXT25 = Sulfametoxazol-Trimetoprim (25 µg)

Tabla 8. Sensibilidad antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva en porcentaje

Antimicrobianos	N° de cepas	Sensible		Resistente		Intermedio	
		N°	%	N°	%	N°	%
Penicilina	45	11	24,44	34	75,56	0	0
Gentamicina	45	37	82,22	7	15,56	1	2,22
Ciprofloxacino	45	37	82,22	1	2,22	7	15,56
Norfloxacino	45	42	93,34	1	2,22	2	4,44
Tetraciclina	45	20	44,44	13	28,89	12	26,67
Eritromicina	45	13	28,89	9	20,00	23	51,11
Clindamicina	45	35	77,78	3	6,66	7	15,56
Sulfametoxazol-Trimetoprim	45	44	97,78	0	0	1	2,22

Figura 10. Porcentajes de resistencia, sensibilidad y sensibilidad intermedia de cepas de *S. aureus* coagulasa positiva



4.3 Prueba de capacidad de formación de biopelículas por el método de microtitulación en placa de *Staphylococcus aureus*

Se observa en la Tabla 9, las absorbancias obtenidas de cada cepa de *Staphylococcus aureus* aisladas de carnes frescas. Además se encontró que el 33,33% (15/45) de las cepas de *Staphylococcus aureus* tienen capacidad fuerte de formar biopelículas. También se obtuvo que 28,89% (13/45), 33,33% (15/45) y 4,45% (2/45) de las cepas de *Staphylococcus aureus* tienen capacidad moderada, débil y no formadora de biopelículas respectivamente, que se pueden ver en la Figura 11.

Tabla 9. Cepas de *S. aureus* coagulasa positiva formadoras de biopelículas empleando como medio TSB con glucosa al 0.25%

CEPA	Absorbancia Cepa 1	Absorbancia Cepa 2	Absorbancia Cepa 3	Absorbancia Cepa 4	Promedio	Desviación Estándar
P1	0.734	0.867	0.854	0.875	0.833	0.0662
P3	0.155	0.171	0.168	0.159	0.163	0.0075
P6	1.027	0.970	0.948	1.200	1.036	0.1141
P7	0.304	0.313	0.208	0.362	0.297	0.0644
P8	0.160	0.177	0.194	0.126	0.164	0.0290
P10	0.133	0.168	0.104	0.169	0.144	0.0312
C11	0.189	0.163	0.155	0.150	0.164	0.0173
C12	0.590	0.435	0.522	0.465	0.503	0.0683
C15	0.351	0.221	0.169	0.208	0.237	0.0790
C16	0.151	0.179	0.242	0.152	0.181	0.0427
C18	1.051	0.819	1.037	0.649	0.889	0.1920
C19	0.736	0.998	0.733	0.537	0.751	0.1892
C20	0.810	0.597	0.532	0.638	0.644	0.1188
P21	0.834	0.969	0.962	0.946	0.928	0.0632
P22	0.293	0.246	0.187	0.264	0.248	0.0447
P23	0.118	0.097	0.156	0.139	0.128	0.0256
P24	0.341	0.383	0.294	0.518	0.384	0.0964
P25	1.185	0.941	0.935	0.994	1.014	0.1172
P26	0.353	0.404	0.297	0.408	0.366	0.0521
P28	0.384	0.611	0.600	0.556	0.538	0.1052
P29	0.629	0.756	0.694	0.632	0.678	0.0602
P30	0.784	0.658	0.821	0.880	0.786	0.0939
C31	0.913	0.780	0.733	0.610	0.759	0.1252
C32	0.770	1.031	0.978	0.944	0.931	0.1130
C34	0.381	0.218	0.210	0.228	0.259	0.0815
C35	0.419	0.388	0.316	0.333	0.364	0.0478
C36	0.533	0.526	0.494	0.506	0.515	0.0180
C37	0.344	0.244	0.393	0.390	0.343	0.0695
C39	0.419	0.379	0.359	0.413	0.393	0.0284
C40	0.768	0.810	0.823	0.867	0.817	0.0408
P41	0.163	0.164	0.199	0.169	0.174	0.0170
P42	0.502	0.396	0.415	0.408	0.430	0.0485
P45	0.238	0.299	0.284	0.337	0.290	0.0409
P47	0.233	0.315	0.338	0.294	0.295	0.0451

Tabla 9 (continuación). Cepas de *S. aureus* coagulasa positiva formadoras de biopelículas empleando como medio TSB con glucosa al 0.25%

P48	0.191	0.195	0.226	0.203	0.204	0.0156
P49	0.965	0.849	0.796	0.812	0.856	0.0763
P50	0.238	0.227	0.237	0.253	0.239	0.0107
C51	0.862	1.172	1.100	0.946	1.020	0.1414
C52	0.953	1.041	0.940	0.876	0.953	0.0679
C53	0.336	0.268	0.353	0.322	0.320	0.0368
C54	0.594	0.623	0.565	0.590	0.593	0.0238
C56	0.365	0.297	0.313	0.264	0.310	0.0421
C57	0.396	0.425	0.363	0.431	0.404	0.0312
C58	0.218	0.216	0.200	0.225	0.215	0.0106
C60	0.216	0.204	0.264	0.235	0.230	0.0262
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0.319	0.263	0.312	0.358	0.313	0.0390
Control Negativo	0.113	0.101	0.128	0.096	0.110	0.0142

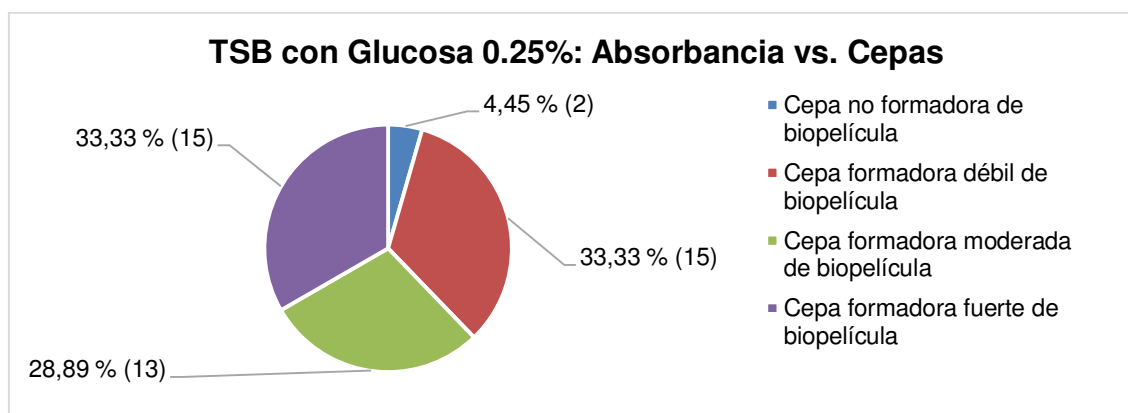
Leyenda:

1. Cálculo del DOC = $0.110 + 3 \cdot 0.0142 = 0.153$

2. Clasificación de capacidad de formación de biopelícula según Stepanovic⁶⁴:

	Cepa no formadora de biopelícula	$DO \leq 0.153$
	Cepa formadora débil de biopelícula	$0.153 < DO \leq 0.306$
	Cepa formadora moderada de biopelícula	$0.306 < DO \leq 0.612$
	Cepa formadora fuerte de biopelícula	$0.612 \leq DO$

Figura 11. Formación de biopelículas de *S. aureus* coagulasa positiva en microplaca de poliestireno que contiene TSB con glucosa 0.25% (DO 570 nm)



4.4 Aislamiento e identificación de *Listeria monocytogenes* en carnes frescas

De las 60 muestras de carnes frescas analizadas procedentes de 3 mercados diferentes de Lima Metropolitana, se logró aislar *Listeria monocytogenes* en 8 muestras expendidas (Figura 12). Además, se presenta la incidencia por cada tipo de carne (Figura 13) y se muestra la presencia o ausencia de *Listeria sp.* (Tabla 10). De las 8 muestras positivas de carnes frescas, 2 muestras correspondieron al mercado Central (10,00%), 4 muestras al mercado Caquetá (20,00%) y 2 muestras del mercado La Parada (10,00%). (Figura 14)

En la Tabla 11 se observa las pruebas de identificación realizadas a las cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de las muestras de carnes frescas de los 3 mercados de Lima Metropolitana. De las 14 cepas sospechosas, que fueron sometidas a las pruebas de identificación, solo ocho cepas dieron positivas para *L. monocytogenes*.

Figura 12. Porcentaje de muestras de carnes frescas positivas al aislamiento de *Listeria monocytogenes* (n = 60)

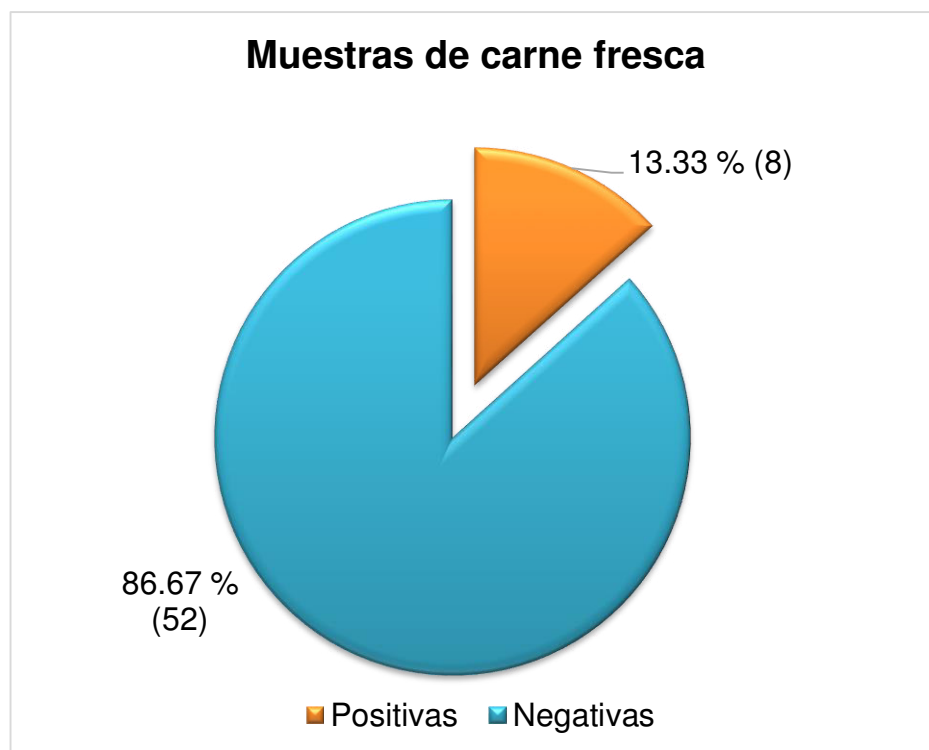


Figura 13. Porcentaje de muestras positivas al aislamiento de *Listeria monocytogenes* por cada tipo de carne fresca (n = 30)

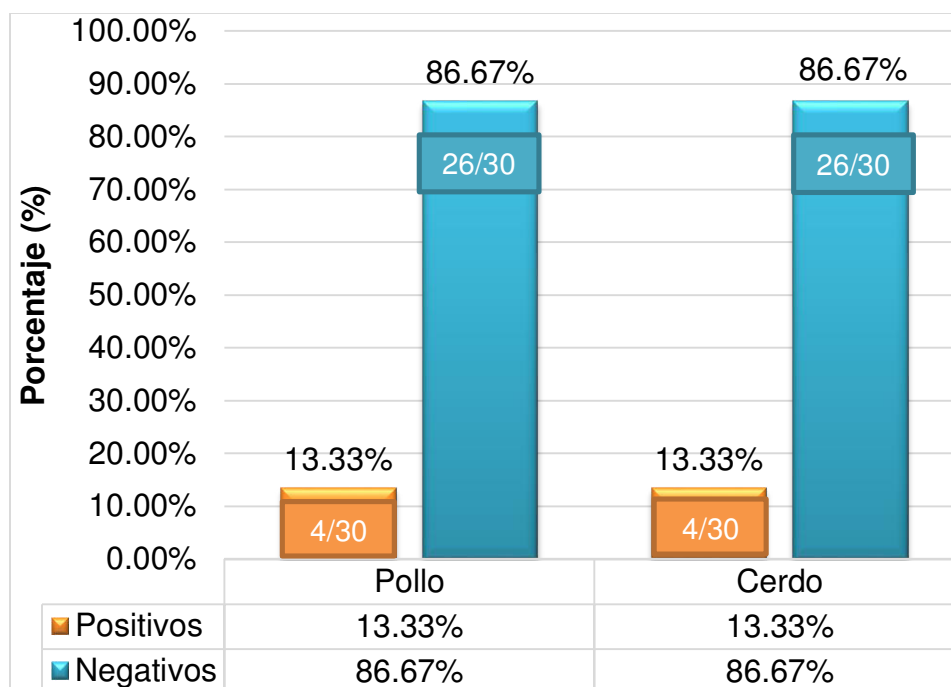


Figura 14. Porcentaje de resultados positivos y negativos al aislamiento de *Listeria monocytogenes* en carnes frescas según el mercado de procedencia (n = 20)

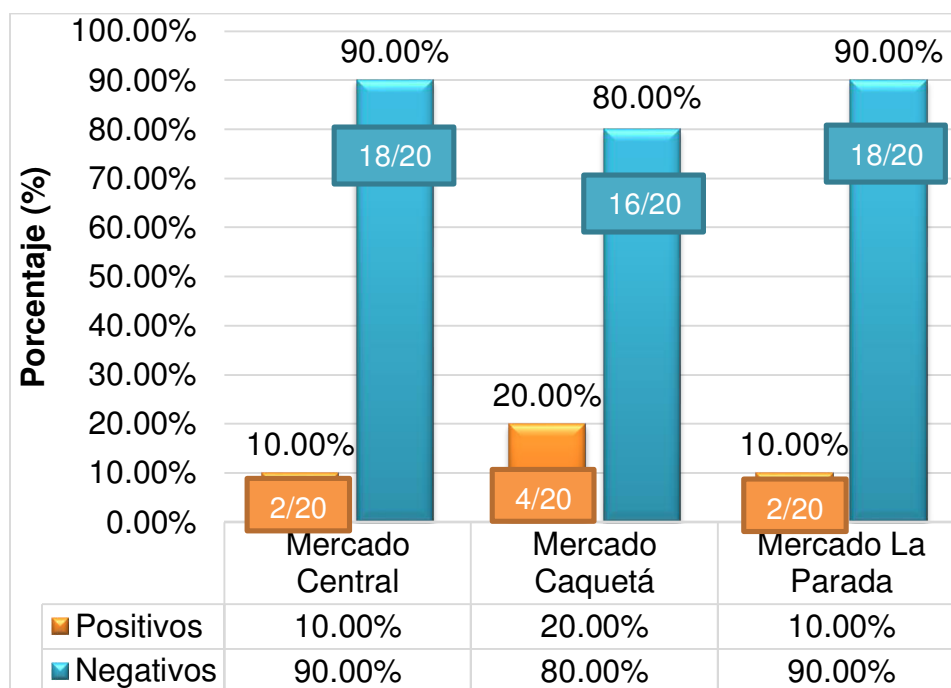


Tabla 10. Presencia o Ausencia de *Listeria sp.* aisladas de carnes frescas

Mercados	Puntos de Venta	Tipo de Carne	Muestra	Presencia o Ausencia
MERCADO CENTRAL (Cercado de Lima) 20 muestras	1	Pollo (P)	P1	Ausencia
	2		P2	Presencia
	3		P3	Ausencia
	4		P4	Presencia
	5		P5	Ausencia
	6		P6	Ausencia
	7		P7	Ausencia
	8		P8	Ausencia
	9		P9	Ausencia
	10		P10	Ausencia
	1	Cerdo (C)	C11	Ausencia
	2		C12	Presencia
	3		C13	Ausencia
	4		C14	Ausencia
	5		C15	Ausencia
	6		C16	Ausencia
	7		C17	Ausencia
	8		C18	Presencia
	9		C19	Ausencia
	10		C20	Ausencia
MERCADO CAQUETÁ (San Martín de Porres) 20 muestras	1	Pollo (P)	P21	Ausencia
	2		P22	Ausencia
	3		P23	Presencia
	4		P24	Ausencia
	5		P25	Ausencia
	6		P26	Ausencia
	7		P27	Presencia
	8		P28	Ausencia
	9		P29	Ausencia
	10		P30	Ausencia
	1	Cerdo (C)	C31	Ausencia
	2		C32	Ausencia
	3		C33	Ausencia
	4		C34	Presencia
	5		C35	Ausencia
	6		C36	Ausencia
	7		C37	Presencia
	8		C38	Presencia
	9		C39	Ausencia
	10		C40	Ausencia
MERCADO LA PARADA (La Victoria) 20 muestras	1	Pollo (P)	P41	Ausencia
	2		P42	Ausencia
	3		P43	Ausencia
	4		P44	Presencia
	5		P45	Ausencia
	6		P46	Ausencia
	7		P47	Ausencia
	8		P48	Ausencia
	9		P49	Ausencia
	10		P50	Ausencia
	1	Cerdo (C)	C51	Presencia
	2		C52	Ausencia
	3		C53	Presencia
	4		C54	Ausencia
	5		C55	Ausencia
	6		C56	Ausencia
	7		C57	Presencia
	8		C58	Ausencia
	9		C59	Ausencia
	10		C60	Presencia
Leyenda: Las muestras resaltadas corresponden a la presencia de <i>Listeria sp.</i> aisladas de carnes frescas				

Tabla 11. Pruebas de identificación de cepas de *Listeria sp.* aisladas de carnes frescas

Muestra	Tinción Gram	Prueba de Catalasa	Movilidad	Caldo Nitrato	Hemólisis	Fermentación de Azúcares					CAMP	Presencia de <i>Listeria monocytogenes</i>
						G	ML	R	MN	X		
P2	+	+	+	-	+ (β)	+	+	+	-	-	+	<i>L. monocytogenes</i>
P4	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	
C12	+	+	+	-	+ (β)	+	+	+	-	-	+	<i>L. monocytogenes</i>
C18	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	
P23	+	+	+	-	+ (β)	+	+	+	-	-	+	<i>L. monocytogenes</i>
P27	+	+	+	-	+ (β)	+	+	+	-	-	+	<i>L. monocytogenes</i>
C34	+	+	+	-	+ (β)	+	+	+	-	-	+	<i>L. monocytogenes</i>
C37	+	+	+	-	+ (β)	+	+	+	-	-	+	<i>L. monocytogenes</i>
C38	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	
P44	+	+	+	-	+ (β)	+	+	+	-	-	+	<i>L. monocytogenes</i>
C51	+	+	+	-	+ (β)	+	+	+	-	-	+	<i>L. monocytogenes</i>
C53	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	
C57	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	
C60	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	
Leyenda: GL.: Glucosa, MAL.: Maltosa, RA.: Ramnosa, MN.: Manitol, XI.: Xilosa												

4.5 Prueba de sensibilidad por el método de Kirby Bauer de *Listeria monocytogenes*

En la Tabla 12, se muestra la susceptibilidad de cepas de *Listeria monocytogenes* a los antibióticos seleccionados y disponibles para el estudio, mediante la medición del diámetro del halo de inhibición, clasificándolas como resistente, sensible e intermedio de acuerdo a los lineamientos según la Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI M100-S28).

Se muestran en la Tabla 13 y la Figura 15, los porcentajes de sensibilidad de las cepas a ampicilina, penicilina, tetraciclina, sulfametoxazol-trimetoprim, gentamicina, eritromicina y vancomicina, que fue del 100%. También se encontró resistencia a la clindamicina en 75,00 %. Además la sensibilidad intermedia fue del 12,50 % para ciprofloxacino.

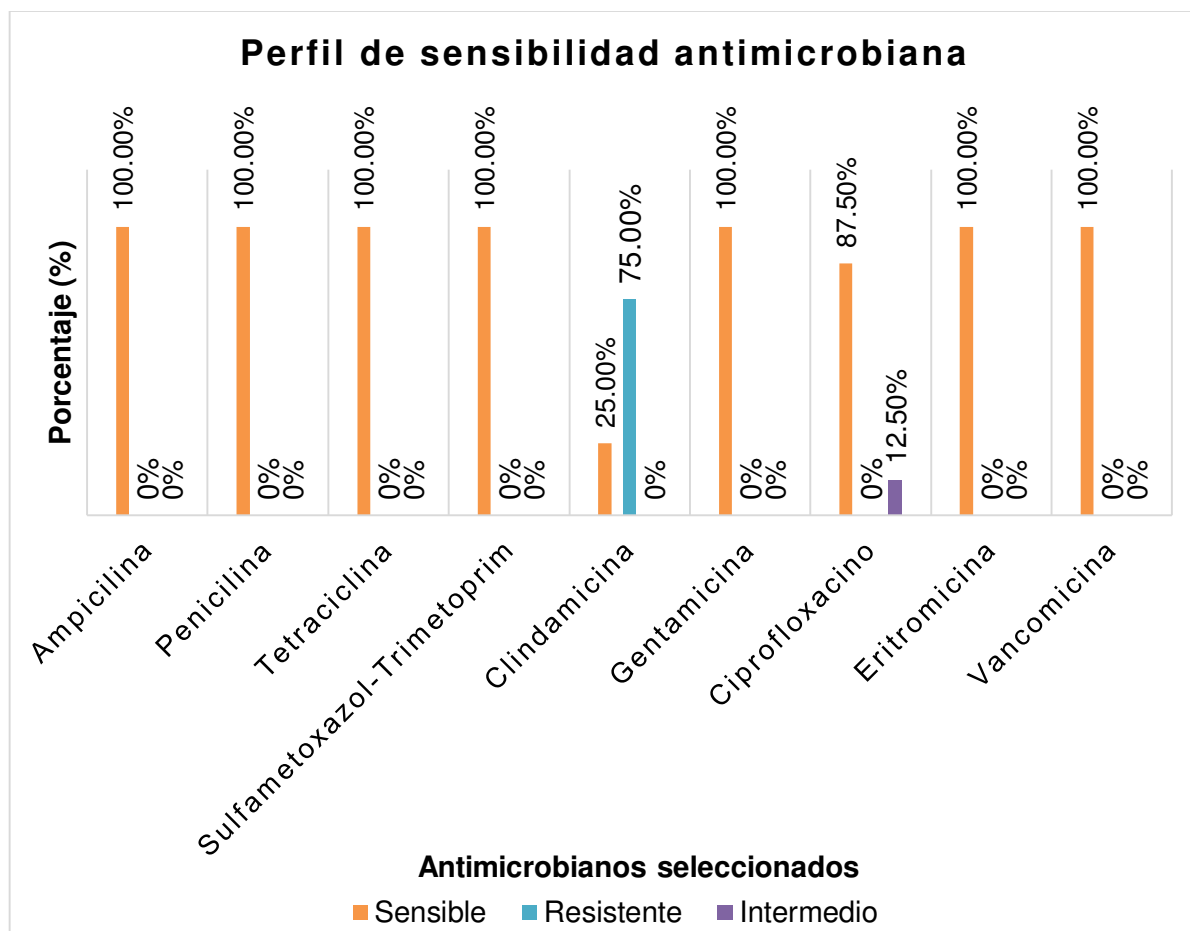
Tabla 12. Perfil de sensibilidad antimicrobiana de cepas de *Listeria monocytogenes*

CEPA	Prueba de sensibilidad antimicrobiana								
	AM10	P10	TE30	SXT25	DA2	CN10	CIP5	E15	VA30
P2	S	S	S	S	R	S	S	S	S
C12	S	S	S	S	R	S	S	S	S
P23	S	S	S	S	R	S	S	S	S
P27	S	S	S	S	S	S	S	S	S
C34	S	S	S	S	R	S	I	S	S
C37	S	S	S	S	R	S	S	S	S
P44	S	S	S	S	S	S	S	S	S
C51	S	S	S	S	R	S	S	S	S
<ul style="list-style-type: none"> Leyenda: R = Resistente S = Sensible I = Intermedio Antimicrobianos: AM10 = Ampicilina (10 µg) P10 = Penicilina (10 µg) TE30 = Tetraciclina (30 µg) SXT25 = Sulfametoxazol-Trimetoprim (25 µg) DA2 = Clindamicina (2 µg) CN10 = Gentamicina (10 µg) CIP5 = Ciprofloxacino (5 µg) E15 = Eritromicina (15 µg) VA30 = Vancomicina (30 µg) 									

Tabla 13. Sensibilidad antimicrobiana de cepas de *Listeria monocytogenes* en porcentaje

Antimicrobianos	N° de cepas	Sensible		Resistente		Intermedio	
		N°	%	N°	%	N°	%
Ampicilina	8	8	100,00	0	0	0	0
Penicilina	8	8	100,00	0	0	0	0
Tetraciclina	8	8	100,00	0	0	0	0
Trimetoprim-Sulfametoxazol	8	8	100,00	0	0	0	0
Clindamicina	8	2	25,00	6	75,00	0	0
Gentamicina	8	8	100,00	0	0	0	0
Ciprofloxacino	8	7	87,50	0	0	1	12,50
Eritromicina	8	8	100,00	0	0	0	0
Vancomicina	8	8	100,00	0	0	0	0

Figura 15. Porcentajes de resistencia, sensibilidad y sensibilidad intermedia de cepas de *Listeria monocytogenes*



4.6 Prueba de capacidad de formación de biopelículas por el método de microtitulación en placa de *Listeria monocytogenes*

Se observa en la Tabla 14, las absorbancias obtenidas de cada cepa de *Listeria monocytogenes* aisladas de carnes frescas. Además se encontró que el 100% (8/8) de las cepas de *Listeria monocytogenes* tienen capacidad débil de formar biopelículas.

Tabla 14. Cepas de *Listeria monocytogenes* formadoras de biopelículas empleando como medio BHI.

CEPA	Absorbancia Cepa 1	Absorbancia Cepa 2	Absorbancia Cepa 3	Absorbancia Cepa 4	Promedio	Desviación Estándar
P2	0.058	0.053	0.058	0.055	0.056	0.0024
C12	0.069	0.062	0.072	0.072	0.069	0.0047
P23	0.063	0.064	0.069	0.069	0.066	0.0032
P27	0.066	0.067	0.067	0.077	0.069	0.0052
C34	0.056	0.051	0.053	0.066	0.057	0.0067
C37	0.070	0.060	0.059	0.065	0.064	0.0051
P44	0.082	0.069	0.081	0.068	0.075	0.0075
C51	0.108	0.098	0.102	0.090	0.100	0.0075
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	0.057	0.057	0.057	0.058	0.057	0.0005
Control	0.045	0.049	0.044	0.048	0.047	0.0024
Leyenda:						
3. Cálculo del DOC = $0.047 + 3 \cdot 0.0024 = 0.054$						
4. Clasificación de capacidad de formación de biopelícula según Stepanovic ⁶⁴ :						
	Cepa no formadora de biopelícula			DO ≤ 0.054		
	Cepa formadora débil de biopelícula			$0.054 < DO \leq 0.108$		
	Cepa formadora moderada de biopelícula			$0.108 < DO \leq 0.216$		
	Cepa formadora fuerte de biopelícula			$0.216 \leq DO$		

5. DISCUSIÓN

Según la Asociación Peruana de Avicultura (APA), el Perú se ubicó como el mayor consumidor de pollo per cápita en Latinoamérica, registrando un promedio anual de casi 47 kilogramos por persona en el 2018, a diferencia de hace 10 años que el consumo de pollo por habitante en la capital era de 40 kilogramos⁷³. Por otro lado, el consumo de la carne (cerdo) en Perú tuvo un crecimiento de 230% entre 2008 y 2018, pasando de 3,5 kilos per cápita a 8 ⁷⁴.

De lo anteriormente expuesto se deduce que el consume de carne de pollo y de cerdo en el Perú es alto, por tal motivo si estas carnes están contaminadas pondrían en riesgo la salud a un gran número de la población.

Las toxiinfecciones alimentarias provocadas por los microorganismos del género *Staphylococcus* y *Listeria* tienen un gran impacto en la salud pública, en el caso del *Staphylococcus aureus* esta es considerada como la tercera causa más importante de enfermedades transmitidas por alimentos en el mundo⁷⁵; por otro lado la listeriosis es una infección grave que se caracteriza por ser una infección de baja morbilidad, pero con una alta tasa de mortalidad de alrededor de 20-30 % ⁷⁶.

En el presente estudio, la incidencia de *Staphylococcus aureus* en carnes frescas fue de 75%. La proporción para la carne de pollo fue 73,33 % y 76,67% para la carne de cerdo. Dichos resultados son similares con las investigaciones realizadas por Owuna et al ⁷⁶ que encontraron 72,5% de *S. aureus* aisladas de carnes frescas de ave, mientras que la prevalencia de *S. aureus* encontrada en carne de cerdo fue de 76,7%, según la investigación de Savariraj et al ⁷⁷. En cambio, en una investigación realizada por Wu et al ⁷⁸ encontró una prevalencia de 67,9% en aves crudas y en el caso de la carne de cerdo se encontró una prevalencia de 47,7%.

En un metaanálisis publicado en el 2017, recolectaron estudios desde el 2000 hasta el 2016; donde encontraron que las tasas de prevalencia de *S. aureus* en productos de pollo eran más altas en Asia (44,6%), seguidas de América (28,1%), África (13,6%) y Europa (9,7%). Así mismo, la tasa de prevalencia de *S. aureus* en

productos de carne cerdo fue más alta en estudios americanos, seguido de estudios asiáticos y europeos ⁷⁹.

En cuanto a la *Listeria monocytogenes*, se encontró una incidencia de 13,33% (8/60) en carnes frescas, donde la distribución de la *L. monocytogenes* fue de 13,33% (4/30) en carne de pollos y de cerdos. Estos resultados difieren con el estudio realizado por Peter et al ⁸⁰ quienes encontraron una tasa de contaminación de *Listeria monocytogenes* de 7,8% (16/205) en carnes de res, cerdo y pollo; teniendo una mayor proporción en carnes cerdo (11,1%), seguido de carne de res (6,5%) y pollos (5,0%).

Sin embargo, en un estudio reciente, se informó que la tasa de contaminación de *L. monocytogenes* en todas las muestras de carne fue de 13,72% (21/153), resultados similares a nuestra investigación. Donde se observó una mayor tasa en muestras de cerdo (20,34%), seguido de carne de res (16,22%) y por último en muestras de pollo fue de 2,63% ⁸¹.

En otra investigación, se notificó una prevalencia de 15,4% (16/104) de carne contaminada con *Listeria monocytogenes*, de las cuales el 10,4% (5/48) se encontró en muestras de pollo; 26,7% (8/30) en muestras de cerdos y 11,5% (3/26) en muestras de carne de res⁸².

De acuerdo con Gordana et al ⁸³, se encontró una incidencia de *Listeria monocytogenes* de 27,6% (8/29) en muestras de carne de pollo, cerdo y res; evidenciando una prevalencia alta de 30% tanto para pollo y cerdo.

En una investigación que se realizó en Perú en el año 2012, se encontró una frecuencia de $13,9 \pm 6,1\%$ de *L. monocytogenes* en las canales porcinas de Lima Metropolitana⁸⁴. Por otro lado, en Trujillo, se logró aislar *Listeria monocytogenes* de 100 muestras analizadas (mesas de expendio de pollo, carne fresca de pollo, queso y leche fresca), obteniendo una proporción de 36% (9/25) en muestras de carne de pollo⁸⁵.

Los resultados encontrados con respecto a la incidencia de *S. aureus* y *Listeria monocytogenes* difieren a otros estudios y las razones pueden atribuirse al tamaño de muestra, tipos de muestra y a las ubicaciones geográficas. Cabe mencionar que la alta incidencia de estos dos microorganismos en nuestro estudio se debería a los malos hábitos de higiene de los manipuladores, falta de instalaciones higiénicas, calidad de agua inadecuada, temperatura subóptima a la que se expende y/o se almacenan los productos y a la inadecuada limpieza del área en el cual se vende los productos.

En el presente estudio, en la prueba de sensibilidad antimicrobiana de los aislados de *S. aureus*, se encontró una resistencia variable a múltiples antimicrobianos. Según nuestro resultado se mostró una mayor resistencia a la penicilina (75,56%), seguido de la tetraciclina (28,89%), eritromicina (20,00%) y gentamicina (15,56%); sin embargo, presentó una menor resistencia al ciprofloxacino y norfloxacino (2,22%). Estos resultados difieren con los hallados por Savariraj et al ⁷⁷, quienes encontraron que todos los aislamientos de *S. aureus* de carne de cerdo fueron resistentes a la ampicilina y a la tetraciclina (100%), seguido de cefoxitina (76,09%), oxacilina (67,39%), eritromicina (60,87%), amoxicilina (58,70%) y novobiocina (50,00%).

En otra investigación se realizó aislamientos de *S. aureus* provenientes de muestras de pollo, encontrándose una resistencia completa a la ampicilina (100%) y una alta resistencia a la oxitetraciclina (99,17%), clorhidrato de doxiciclina (88,33%), amoxicilina (86,66%), ciprofloxacina (77,5%), cefalexina (38,33%) y una menor resistencia a la gentamicina (13,33%)⁸⁶.

Otros investigadores informaron que la mayoría de las cepas de *S. aureus* aisladas de muestras de carne fresca presentaron una alta resistencia a la ampicilina, penicilina, tetraciclina, amoxicilina y eritromicina ^{78, 87, 88}.

La alta resistencia a las penicilinas en nuestro estudio se debería a que este grupo farmacológico se usa ampliamente para el control y tratamiento de enfermedades

respiratorias, gastrointestinales, urogenitales e infecciones dérmicas y tejidos blandos en porcinos y aves⁷⁷.

En el presente estudio se observó que las cepas de *S. aureus* presentaron una alta sensibilidad a la sulfametoxazol-trimetoprim (97,78%), seguido de norfloxacin (93,34%), gentamicina y ciprofloxacino (82,22%), clindamicina (77,78%), oxacilina (62,22%) y presentó una menor sensibilidad a la eritromicina (28,89%); sin embargo, este último presentó una mayor sensibilidad intermedia (51,11%).

Estos resultados son similares a los reportados por Savariraj et al ⁷⁷, el cual en su investigación reportó un alto porcentaje de sensibilidad con respecto al cloranfenicol (95,65%), neomicina (91,30%), vancomicina y kanamicina (84,78%), gentamicina (52,17) y ciprofloxacino (50%). Otros investigadores también reportaron en carne de res, pollo y cerdo una alta sensibilidad a la vancomicina y gentamicina^{75, 89}.

De acuerdo con las referencias una mayor sensibilidad a los aminoglucósidos se podría atribuir a que estos fármacos rara vez son usados actualmente, ya que la resistencia a estos antibióticos se ha informado décadas atrás⁷⁷.

Con respecto a la sensibilidad antimicrobiana de *Listeria monocytogenes*, se encontró que todos los aislamientos eran sensibles a todos los antimicrobianos probados en el presente estudio (ampicilina, penicilina, tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol, gentamicina, ciprofloxacino, eritromicina y vancomicina). Sin embargo, se observó una sensibilidad intermedia al ciprofloxacino (12,50%) y una resistencia de 75,00% a la clindamicina. Nuestros resultados son parcialmente similares a un estudio anterior, quienes encontraron que las cepas de *L. monocytogenes* eran sensibles a la amoxicilina, ampicilina, cefotaxima, cefalotina, cloranfenicol, ciprofloxacina, eritromicina, gentamicina, kanamicina, neomicina, penicilina, estreptomina, sulfametoxazol-trimetoprim y vancomicina; además encontraron una resistencia del 100% al ácido nalidíxico y al ácido oxolínico, un 84% a la clindamicina, un 13% a la tetraciclina y un 9% a la oxitetraciclina⁹⁰.

En otro estudio, también se encontró una sensibilidad a la ampicilina, amikacina, cloranfenicol, gentamicina, imipenem, penicilina G, sulfametoxazol-trimetoprim y tetraciclina. Sin embargo, en esta investigación un aislamiento mostró una susceptibilidad intermedia a la tetraciclina⁹¹.

Por otro lado en una investigación realizada por Islam et al ⁹², encontraron que las cepas aisladas eran sensibles al ciprofloxacino, gentamicina y vancomicina, pero resistentes a la penicilina y ampicilina.

De acuerdo con nuestros resultados solo se observó una resistencia a la clindamicina (75,00%) y una sensibilidad intermedia al ciprofloxacino de 12,50%, por otro lado no se encontró resistencia a los otros antimicrobianos probados, y esto resulta positivo, puesto que se sabe que los fármacos de primera elección para tratar la listeriosis humana son la ampicilina intravenosa sola o en combinación con gentamicina, y en casos de mala respuesta al tratamiento inicial se usa el cotrimoxazol (sulfametoxazol-trimetoprim)⁹³.

Cabe mencionar que la sensibilidad intermedia al ciprofloxacino (12,50%) encontrada en nuestro estudio, es también notificada en la investigación realizada por Lyon et al⁹⁴ quienes reportaron un 34% (54/157) de muestras provenientes de una planta de procesamiento de aves de corral.

Así mismo en nuestro estudio se encontró un alto porcentaje de resistencia a la clindamicina pero sensibles a la eritromicina, estos resultados coinciden con la investigación realizada por Sakaridis et al⁹⁰ quienes obtuvieron un 84% de resistencia, mientras que en otro estudio se obtuvo un 35%⁹⁵. Se hace mención de esta resistencia y susceptibilidad, puesto que es bien conocido que la resistencia a la clindamicina puede ser inducido por la eritromicina, ya que estos comparten un mecanismo casi igual contra los microorganismos, la cual tiene como finalidad el que inhiba la síntesis de proteínas, por la unión a la subunidad 50S del ribosoma de la bacteria, de manera específica, alrededor del centro de una enzima llamada peptidiltransferasa (PTC) ⁹⁶.

De acuerdo a las referencias se sabe que en el tracto gastrointestinal y en las plantas de procesamiento de alimentos, *Listeria monocytogenes* puede exponerse a la conjugación con *Enterococcus spp*, *Staphylococcus spp*, los cuales pueden portar plásmidos que codifican resistencia a antimicrobianos. Este hecho se ha demostrado que ocurre con la trimetoprima, vancomicina, tetraciclina y ciprofloxacino ^{97, 98}. Además estos mismos artículos indican que la resistencia adquirida al ciprofloxacino puede estar relacionada con el uso histórico de este antibiótico en la producción de pollos de engorde.

Con respecto a una biopelícula, se considera como una matriz biológicamente activa formada por células de una o varias especies y sustancias extracelulares en asociación con una superficie sólida, que pueden ser superficies minerales, tejidos vivos o muertos ya sea de animales o plantas, polímeros sintéticos, cerámicas y aleaciones de metales⁹⁹.

De acuerdo a las referencias, la composición del medio es probablemente el factor más importante que influye en la capacidad de las bacterias para producir biopelículas en condiciones in vitro, aunque es difícil optar por un único medio (BHI o TSB), puesto que existe evidencia que algunas cepas de una especie estafilocócica determinada producen mayores cantidades de biopelícula en TSB, mientras que otros lo hacen en BHI; sin embargo, el TSB es el medio más utilizado para la prueba de formación de biopelículas, además se ha demostrado que el medio suplementado con glucosa (0.25% o 1%) aumenta la capacidad de *Staphylococcus* para formar biopelículas⁷¹. En nuestro estudio se usó el medio TSB suplementado con glucosa al 0.25%, en contraste con otro estudio realizado por, Zhang et al⁹⁹ quienes realizaron la prueba de capacidad de formación de biopelículas usando como medio BHI al 1%, otro estudio al igual que el nuestro uso el medio TSB suplementado con glucosa, quienes también encontraron que la capacidad de formación de biopelículas es similar si usa una microplaca de poliestireno o de acero inoxidable⁷⁰.

En nuestra investigación, no todos aislados de *Staphylococcus aureus* fueron formadores de biopelículas, a diferencia del estudio realizado por Zhang et al⁹⁹ quienes, si encontraron que todos los aislados fueron formadores de biopelículas, además se evidenció que los aislamientos de carne cruda (proveniente de mataderos y mercados terminales) exhibieron una mayor capacidad para formar biopelículas fuertes en contraste con los aislamientos provenientes de las granjas porcinas. Nuestros resultados coinciden con la investigación anterior puesto que en nuestro estudio también se reportó que la mayoría de los aislados fueron formadores fuertes de biopelícula (33,33%)

Con respecto a la formación de biopelículas de *Listeria monocytogenes*, en nuestro estudio se utilizó el medio BHI, y se encontró que todos los aislamientos eran formadores débiles de biopelícula. Estos resultados coinciden con otros estudios quienes indican que las células listeriales son generalmente formadores débiles o moderados de biopelículas^{100, 101}.

De la misma manera, en un estudio realizado por Li et al¹⁰² observó una mayor capacidad de formación de biopelículas en caldo BHI seguido de medio Hsiang-Ning Tsai (HTM) y caldo Luria-Bertani broth (LB). Así mismo en otra investigación también informaron una mejor formación de biopelículas en el caldo BHI seguido del caldo TSB y luego el caldo de carne¹⁰³.

Por otro lado, en un estudio donde se aisló cepas de *Listeria monocytogenes* de diferentes fuentes (cepas de casos clínicos en animales, en humanos, muestras de carne y muestras de leche y productos lácteos) se evidenció que solo de las cepas aisladas de leche y productos lácteos eran formadores fuerte de biopelícula, a diferencia de las demás cepas aisladas que en ninguna se observó formadoras fuertes sino formadores débiles y moderados, al igual que en nuestro estudio donde se observó solo cepas formadores débiles de biopelículas¹⁰⁴.

6. CONCLUSIONES

- Se aisló e identificó 45 cepas de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva (donde 22 cepas correspondieron a carne de pollo y 23 a carne de cerdo) y 8 cepas de *Listeria monocytogenes* (donde cada 4 cepas correspondieron a cada tipo de carne).
- Se encontró una incidencia de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva del 75% (45/60) y de *Listeria monocytogenes* fue 13,33% (8/60), en carnes frescas provenientes de los mercados de Lima metropolitana.
- Las cepas de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva aisladas presentaron mayor resistencia a la penicilina (75,56%) y tetraciclina (28,89%). También se observó una mayor sensibilidad a sulfametoxazol-trimetoprim (97,78%), gentamicina y ciprofloxacino (82,22%) y clindamicina (77,78%). Además, se encontró una sensibilidad intermedia de 51,11% para la eritromicina.
- Las cepas de *Listeria monocytogenes* presentaron una resistencia de 75% a clindamicina y no presentaron resistencia a la ampicilina, penicilina, tetraciclina, sulfametoxazol-trimetoprim, gentamicina, eritromicina y vancomicina. Además, se encontró una sensibilidad intermedia de 12,5% al ciprofloxacino.
- Se encontró que las cepas de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva, el 33,33% (15/45) tienen capacidad fuerte, el 28,89% (13/45) tienen capacidad moderada, el 33,33% (15/45) tienen capacidad débil y el 4,45% (2/45) no forman biopelículas; mientras que el 100% (8/8) de las cepas de *Listeria monocytogenes* tienen capacidad débil de formar biopelículas.

7. RECOMENDACIONES

En el estudio se recomienda realizarlo en una mayor cantidad de muestras para poder obtener resultados estadísticamente más significativos con respecto a la incidencia de *S. aureus* y *L. monocytogenes*. Además el crecimiento de estos microorganismos podría verse influenciado por una serie de factores como las características propias de la carne, así como el pH y nivel de nutrientes, los cuales pueden afectar en su crecimiento y la formación de biopelículas, por lo cual debe incentivarse una mayor investigación.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kopper G, Calderón G, Schneider S, Domínguez W y Gutierrez G. Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. Informe Técnico sobre ingeniería agrícola y alimentaria. [Internet]. 2009 [consultado 11 de Jun 2018]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i0480s.pdf>
2. Bayona M. Evaluación microbiológica de alimentos adquiridos en la vía pública en un sector del norte de Bogotá. Rev U D C A Act Div Cient. 2009; 12 (2): 9-17.
3. Lavigne J, Tiene B, Jeandrot A, Lechiche C. Toxiinfecciones alimentarias colectivas (TIAC). Acta Bioquím Clín Latinoam. 2008; 42 (1): 79-87.
4. Mercado M, Ávila J, Rey M, Montoya M, Gamboa A, Carrascal A, et al. Brotes por *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* asociados al consumo de pollo. Biomédica. 2012 32(3):375-385. doi:10.7705/biomedica.v32i3.697
5. Falcón N, Ortega C, Gorniak S, Villamil L, Ríos C, Simón M. El problema de la resistencia a antibióticos en salud pública. Rev Sapuvet de Salud Pub. 2010; 1(1): 75-88.
6. Téllez S. Los Biofilms y su repercusión en la Industria Alimentaria. [Internet] VISAVET Outreach 9 Jun Journal. 2010. [consultado 17 Jun 2018]. Disponible en: <https://www.visavet.es/es/articulos/biofilms-repercusion-industria-alimentaria.php>
7. Ministerio de Agricultura. Producción pecuaria e industria avícola 2010. Oficina de Información agraria. [Internet]. 2011 [consultado 11 de Jun 2018]. Disponible en: <http://siea.minag.gob.pe/siea/?q=produccion-pecuaria-e-industria-avicola>
8. Gajdács M. The Continuing Threat of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Antibiotics (Basel). 2019;8(2):52. doi:10.3390/antibiotics8020052
9. García A, Martínez C, Juárez R, Téllez R, Paredes M, Herrera M, et al. Resistencia a la meticilina y producción de biopelícula en aislamientos clínicos de

Staphylococcus aureus y *Staphylococcus coagulasa* negativa en México. Biomedica. 2019; 39: 513-523. doi: 10.7705/biomedica.4131

10. Efthimiou G, Tsiamis G, Typas MA, Pappas KM. Transcriptomic Adjustments of *Staphylococcus aureus* COL (MRSA) Forming Biofilms Under Acidic and Alkaline Conditions. Front Microbiol. 2019;10: 2393 doi:10.3389/fmicb.2019.02393

11. Gnanamani A, Hariharan P, Satyaseela M. *Staphylococcus aureus*: Overview of Bacteriology, Clinical Diseases, Epidemiology, Antibiotic Resistance and Therapeutic Approach. Frontiers in *Staphylococcus aureus* [Internet]. Zagreb: SPi Global; 2017 [consultado 07 Dic 2019]. Disponible en: https://books.google.com.pe/books?id=rviODwAAQBAJ&pg=PA168&dq=Frontiers+in+Staphylococcus+aureus&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwj2kJ_T1a7mAhWRjFkKHdxMA40Q6AEIMTAB#v=onepage&q=Frontiers%20in%20Staphylococcus%20aureus&f=false

12. Yépez G. Prevalencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en mucosa nasal del Centro Médico Familiar Integral y de Especialidades, Diálisis “La Mariscal”, 2018. [Tesis para optar título profesional de Bioquímico Clínico]. Quito, Ecuador: Universidad Central del Ecuador; 2019.

13. Mohamed N, Timofeyeva Y, Jamrozy D, Rojas E, Hao L, Silmon de Monerri N, et al. Molecular epidemiology and expression of capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus* clinical isolates in the United States. PLoS One. 2019;14(1):e0208356. doi: 10.1371/journal.pone.0208356.

14. Krithiga N, Antony P, Tollersrud T, Mukhopadhyay H, Pillai R, Vijayalakshmi P et al. Molecular Typing Of Capsular Polysaccharides of *Staphylococcus Aureus* Isolated From Cases of Bovine Mastitis by PCR. Con Dai Vet Sci. 2018 1(1): 13-16. doi: 10.32474/CDVS.2018.01.000102.

15. Manfredi E, Rivas M. Brote de intoxicación alimentaria en un jardín de infantes de la provincia de Buenos Aires. Rev Argent Microbiol. 2019. doi: 10.1016/j.ram.2018.08.008

16. Alarcon M, Oyarzo C, Escudero C, Cerda F, Valenzuela F. Portación de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico tipo A, en frotis nasofaríngeos en manipuladores de alimentos. Rev Med Chile. 2017;145: 1559-1564. doi: 10.4067/s0034-98872017001201559
17. Oliveira D, Borges A, Simões M. *Staphylococcus aureus* Toxins and Their Molecular Activity in Infectious Diseases. Toxins (Basel). 2018;10(6):252. doi:10.3390/toxins10060252
18. Salina M, Scholz L, Servian N, Romero M, Samudio T, Ruiz V et al. Portación de *Staphylococcus Aureus* en manipuladores de alimentos de servicios gastronómicos de Asunción, Paraguay (2017). Rev Salud Pub Parag. 2018; 8 (2): 28-33. doi: 10.18004/rspp.2018.diciembre.28-33
19. Ministerio de Salud. Boletín Epidemiológico del Perú Vol 28 - SE 15-2019. Lima, Peru: Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades; 2019. 372-395.
20. Jamshidi A, Zeinali T. Significance and Characteristics of *Listeria monocytogenes* in Poultry Products. Int J Food Sci. 2019; 2019:7835253. doi:10.1155/2019/7835253
21. Fernandez M. Control microbiológico de *Listeria monocytogenes* en alimentos para consumo destinado a lactantes. [Tesis para optar título profesional de Químico Farmacéutico]. Sevilla: Universidad de Sevilla; 2016. 40 p.
22. Hitchins A, Jinneman K. Bacteriological Analytical Manual Chapter 10 Detection of *Listeria monocytogenes* in Foods and Environmental Samples, and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. FDA BAM Ch 10 [Internet]. 2017 [consultado 12 Ene 2019] Disponible en: <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071400.htm>

23. Chen M, Cheng J, Zhang J, Chen Y, Zeng H, Xue L, *et al.* Isolation, Potential Virulence, and Population Diversity of *Listeria monocytogenes* From Meat and Meat Products in China. *Front Microbiol.* 2019; 10: 946. doi: 10.3389/fmicb.2019.00946.
24. Sotgiu G, Muresu N, Dettori M, Mura E, Cossu A, Dolores Masia M, *et al.* A Case of *Listeria monocytogenes* ST-219 Meningo-Encephalitis. *Int J Environ Res Public Health.* 2018;16(1):1-7. doi: 10.3390/ijerph16010008.
25. Alonso A. Métodos de detección y control de *Listeria monocytogenes* en la industria alimentaria. [Tesis de maestría]. Oviedo: Universidad de Oviedo; 2018.
26. Elizabet F. Listeriosis cerebral en el modelo murino: patogénesis y prevención. [Tesis doctoral]. Cantabria, España: Universidad de Cantabria; 201724. Rodriguez J. Panorama de la infección por *Listeria monocytogenes*. *Rev. Chil Infectol.* 2018; 35(6): 649-657. doi: 10.4067/S0716-10182018000600649
27. Rodriguez J. Panorama de la infección por *Listeria monocytogenes*. *Rev. Chil Infectol.* 2018; 35(6): 649-657. doi: 10.4067/S0716-10182018000600649
28. Listeria: por qué es tan peligrosa la infección por esta bacteria y cómo se puede evitar [Internet]. BBC News Mundo [consultado 23 Nov 2019]; Salud. Disponible en: <https://www.bbc.com/mundo/noticias-49421745>
29. Bentúe M. La Sociedad Española de Epidemiología ante el brote de listeriosis asociado al consumo de productos fabricados por MAGRUDIS SL [Internet]. Sociedad Española de Epidemiología [consultado 23 Nov 2019]; 2019. Disponible en: https://www.seepidemiologia.es/documents/dummy/Listeria_SEE_Posicionamiento_GTVigilancia_03.09.2019_final.pdf
30. Ministerio de Salud. Boletín Epidemiológico del Perú Vol 28 - SE 08-2019. Lima, Peru: Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades. 2019. 190-212.

31. Villanueva D, Salazar M. Capacidad de formación de biopelículas de cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de quesos frescos procedentes de mercados del Cercado de Lima. *An Fac med.* 2017;78(3):322-325. doi: 10.15381/anales.v78i3.13768
32. Pèrez M. Prevalencia de *Listeria Monocytogenes* en salchichas tipo Huacho provenientes de los mercados de abastos del Cercado de Lima. [Tesis de maestría]. Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2013.
33. Cabanillas G. Determinación de la presencia de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos artesanales provincia de Huarochirí, Lima-Perú. [Tesis para optar título profesional de licenciado en Biología]. Lima, Perú: Universidad Ricardo Palma; 2019.
34. Alos J. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2015; 33(10): 692-699. doi: 10.1016/j.eimc.2014.10.004
35. OMS. ¿Qué es la resistencia a los antimicrobianos? [Internet]. 2017. [consultado 15 de Ene 2019]; Disponible en: <http://www.who.int/features/qa/75/es/>
36. Perez H, Robles A. Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia Bacteriana. *Rev. Med MD.* 2013; 4(3): 186-191.
37. Oromi J. Resistencia bacteriana a los antibióticos. *Med. Int.* 2000; 36(10): 367-369.
38. Munita J, Arias C. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr.* 2016; 4(2): 1-37. Doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015
39. Gonzales C. Antibiotic adjuvants – A strategy to unlock bacterial resistanceto antibiotics. *Bioorg Med Chem Lett.* 2016; 27: 4221-4228. doi: 10.1016/j.bmcl.2017.08.027

40. Galleo G, Otarola A, Urbano E, Morales C. Multirresistencia bacteriana: Reto terapéutico en trasplante renal. Univ Salud. 2019;21(1):72-87. doi: 10.22267/rus.192101.141
41. Peterson E, Kaur P. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. Front Microbiol. 2018;9 :2928. Doi: 10.3389/fmicb.2018.02928
42. Moreno C, González R, Beltrán C. Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. Rev Otorrinolaringol Cir Cabeza Cuello. 2009; 69(2): 185-192. doi: 10.4067/S0718-48162009000200014
43. Kırmusaoğlu S. MRSA and MSSA: The Mechanism of Methicillin Resistance and the Influence of Methicillin Resistance on Biofilm Phenotype of *Staphylococcus aureus*. IntechOpen. 2017. doi: 10.5772/65452
44. Haaber J, Penadés J e Ingmer H. Transfer of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol. 2017; 25(11), 893–905. doi: 10.1016/j.tim.2017.05.011
45. Foster T. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects, FEMS Microbiol Rev. 2017; 41 (3): 430-449. doi: 10.1093/femsre/fux007
46. Olaimat A, Al-Holy M, Shahbaz H, Al-Nabulsi A, Abu M, Osaili T. et al. Emergence of Antibiotic Resistance in *Listeria monocytogenes* Isolated from Food Products: A Comprehensive Review. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2018; 17: 1277 - 1292. doi: 10.1111/1541-4337.12387
47. Romanova N, Wolffs P, Brovko L, Griffiths M. Role of efflux pumps in adaptation and resistance of *Listeria monocytogenes* to benzalkonium chloride. Appl Environ Microbiol. 2006; 72 (5):3498-503. doi: 10.1128 / AEM.72.5.3498-3503.2006

48. Chokshi A, Sifri Z, Cennimo D, Horng H. Global Contributors to Antibiotic Resistance. *J Glob Infect Dis.* 2019;11(1): 36-42. doi: 10.4103/jgid.jgid_110_18
49. Michael C, Dominey D, Labbate M. The antimicrobial resistance crisis: causes, consequences, and management. *Front Public Health.* 2014; 2 (145): 1-8. doi: 10.3389/fpubh.2014.00145
50. Castro-Sánchez E, Moore LS, Husson F, Holmes AH. What are the factors driving antimicrobial resistance? Perspectives from a public event in London, England. *BMC Infect Dis.* 2016;16(1):465. doi:10.1186/s12879-016-1810-x
51. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Eight Informational Supplement. Document M100-S28. Pennsylvania, USA, 2018; 38(3):16-62, 76-85.
52. Eraso-Cadena M, Ríos-Osorio L. Principales características de las biopelículas relacionadas con procesos patológicos descritos en humanos en los últimos 10 años, revisión sistemática. *Investigaciones Andina.* 2016. 18 (32): 1491-1506. doi: 10.33132/01248146.556
53. Jamal M, Tasneem U, Hussain T, Andleeb S. Bacterial Biofilm: Its Composition, Formation and Role in Human Infections. 2015; 4 (3): 1-14.
54. Chmielewski R, Frank J. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2003; 2 (1): 22-32. doi: 10.1111/j.1541-4337.2003.tb00012.x
55. Stewart P, Franklin M. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol.* 2008; 6 (3): 199-210. doi: 10.1038 / nrmicro1838.
56. Lewandowski Z, Beyenal H. Fundamentals of biofilm research. Boca Raton: Editorial CRC Press; 2014.
57. Castrillon L, Palma A, Padilla M. Importancia de las biopelículas en la práctica médica. *Dermatología Rev Mex.* 2010; 54 (1): 14-24.

58. Serrano J, Herrera D, León R. Placa bacteriana: Su papel en las enfermedades de la encía. Factores que modifican la acción de la placa bacteriana. Madrid: Editorial Médica Panamericana;2009.
59. Galie S, Garcia C, Miguelez E, Villar C, Lombo F. Biofilms in the food industry: Health aspects and control methods. 2018; 9:1-18. doi: 10.3389/fmicb.2018.00898
60. Navia D, Villada H, Mosquera S. Las biopelículas en la industria de alimentos. Rev Bio Agro. 2010; 8 (2):118-128.
61. Herten M, Bisdas T, Knaack D, Becker K, Osada N, Torsello G et al. Rapid in Vitro Quantification of *S. aureus* Biofilms on Vascular Graft Surfaces. Front Microbiol. [Internet]. 2017 [consultado 25 de Ene 2019]; 8:2333. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5723318/pdf/fmicb-08-02333.pdf>
62. Wilson C, Lukowicz R, Merchant S, Valquier-Flynn H, Caballero J, Sandoval J, et al Quantitative and Qualitative Assessment Methods for Biofilm Growth: A Mini-review. Res Rev J Eng Technol. 2018;6(4): 1-42.
63. Djordjevic D, Wiedmann M, McLandsborough LA. Microtiter Plate Assay for Assessment of *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. Appl Environ Microbiol. 2002; 68 (6): 2950-2958. doi: 10.1128 / AEM.68.6.2950-2958.2002
64. Ministerio de Salud de Perú, Dirección General de Salud Ambiental. Manual de Análisis microbiológico de alimentos [Internet]. Lima-Perú, 2001. [consultado 18 Jun 2018] Disponible en: http://bvs.minsa.gob.pe/local/DIGESA/61_MAN.ANA.MICROB.pdf
65. Ministerio de Salud. DIGESA. Procedimiento para la Recepción de Muestras de Alimentos y Bebidas de Consumo Humano en el Laboratorio de Control Ambiental de la Dirección General de Salud Ambiental del Ministerio de Salud [Internet]. Directiva Sanitaria N° 032 - MINSA/DIGESA - Perú 2011. [consultado 18 Jun 2018] Disponible en: <http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/1594.pdf>

66. Moreno B, Díez V, García M, Menes I, Gutiérrez L, Francisco J. ICMSF. Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para alimentos. Microorganismos de los alimentos 1: Su significado y método de numeración. Zaragoza, España: Editorial Acribia S.A. ;1999.
67. Arencibia D, Rosario L, Gamez R. Métodos generales de conservación de microorganismos. La Habana, Cuba: Finlay Ediciones;2008
68. Rodriguez P, Arenas R. Hans Christian Gram y su tinción. Dermat, Cosm, Méd y Quir. 2018; 16 (2): 166-167.
69. Christian D. Merck Microbiology Manual. 12° Edition. Germany: Merck KGaA, 2012
70. Avila M, Iñiguez M, Solis O, Gonzales J, Guerrero P, Gutierrez M. Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus* Isolated from Food Contact Surfaces in the Dairy Industry of Jalisco, Mexico. Journal food Quality [Internet] 2018 [consultado 22 Jul 2019]; pag 1-8. Disponible en: https://pdfs.semanticscholar.org/77bf/c5b64c6d6156c23f8e7b6251b57f3021a444.pdf?_ga=2.55319656.297351413.1566174989-2056805692.1565669452
71. Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, Bonaventura G, Djukic S, Cirkovic I and Ruzicka F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. APMIS 2007; 115 (8): 891-9. doi: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
72. Urbano-Cáceres EX, Aguilera-Becerra AM, Jaimes-Bernal CP. Determinación del perfil de sensibilidad antibióticos de *Listeria spp.* en aislamientos de leche cruda de vaca, Tunja. Revista Investig Salud Univ Boyacá. 2017; 4(1): 38-52. doi: 10.24267/23897325.195
73. Whitney M. Consumo de pollo por habitante en el Perú llegará a 48 kilogramos este año [Internet]. Diario Gestión. [Consultado el 27 Jueves 13 de junio del 2019];

Economía. Disponible en: <https://gestion.pe/economia/consumo-habitante-peru-llegara-48-kilogramos-ano-271506>

74. Manuela Z. ¿Por qué comemos más carne de cerdo? [Internet]. El Comercio [Consultado el jueves 13 de junio del 2019]; Economía. Disponible en: <https://elcomercio.pe/economia/dia-1/comemos-consumo-carne-cerdo-noticia-ecpm-644992>

75. Nazneen N, Mahmuda A, Zinat F, Abdul J, Inkeyas U, Zonaed S and Kamaruddin. Detection of *Staphylococcus aureus* in Frozen Chicken Rinse through Bacteriological and Nuc Gene Specific PCR Methods and their Drug Resistance Patterns in Southern Chittagong, Bangladesh. Res J Microbiol. 2014; 9: 251-264. doi: 10.3923 / jm.2014.251.264

76. Owuna G, Abimiku R, Nkene I, Joseph G and Ijalana O. Isolation and Antibiotic Susceptibility of *Staphylococcus aureus* from Fresh Poultry Meat Sold in Keffi Metropolis, Nigeria. Int J Res Stud Biosci. 2015; 3 (11): 1-5. doi: 10.13140 / RG.2.2.23688.88328

77. Savariraj W, Ravindran N, Kannan P, Paramasivam R, Kumarasamy P, Rao V. Prevalence, antimicrobial susceptibility and virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from pork meat in retail outlets in India. J Food Saf [Internet]. 2019 [consultado 19 May 2019]; 39: e12589. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/jfs.12589>

78. Wu S, Huang J, Wu Q, Zhang J, Zhang F, Yang X, et al. *Staphylococcus aureus* Isolated From Retail Meat and Meat Products in China: Incidence, Antibiotic Resistance and Genetic Diversity. Front Microbiol [Internet]. 2018 [consultado 19 May 2019]; 9: 2767. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6249422/>

79. Ou Q, Peng Y, Lin D, Bai C, Zhang T, Lin J, et al. A Meta-Analysis of the Global Prevalence Rates of *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *S. aureus* Contamination of Different Raw Meat Products. J. Food Prot [Internet]. 2017

[consultado 19 May 2019]; 80 (5): 763-774. Disponible en: <https://jfoodprotection.org/doi/pdf/10.4315/0362-028X.JFP-16-355>

80. Peter A, Umeh E, Azua E and Obande G. Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of *Listeria monocytogenes* Isolated from Beef, Pork and Chicken Sold in Makurdi Metropolis. Br Microbiol Res J. 2016; 14(5): 1-7. Doi: 10.9734/BMRJ/2016/25663

81. Liu A, Shi C. Pork juice promotes biofilm formation in *Listeria monocytogenes*. J Food Saf. 2018;e12439. doi: 10.1111/jfs.12439

82. Indrawattana N, Nibadhasobon T, Sookrung N, Chongsang-nguan M, Tungtrongchitr A, Makino S *et al.* Prevalence of *Listeria monocytogenes* in Raw Meats Marketed in Bangkok and Characterization of the Isolates by Phenotypic and Molecular Methods. J Health Popul Nutr. 2011; 29(1): 26-38. doi: 10.3329 / jhpn.v29i1.7565

83. Gordana D, Suncica K, Olivera J, Dragoljub C, Sinisa M. Presence of *Listeria* species in fresh meats from retail markets in Serbia. Apteft. 2010; 41: 1-6. doi: 10.2298/APT1041001D

84. Barrientos E, Lucas J, Ramos Daphne, Rebatta M, Arbaiza T. Presencia de *Listeria monocytogenes* en canales porcinos en Lima, Perú. Rev investig vet Perú. 2015; 26(1): 135-139.

85. Gallardo J. Caracterización fenotípica de *Listeria monocytogenes* aislados de superficie donde se expende pollo y de alimentos de los mercados de la ciudad de Trujillo, Perú 2012. [Tesis Maestria]. Trujillo-Perú: Universidad Nacional de Trujillo, 2016.

86. Nazneen N, Mahmuda A, Zinat F, Abdul, J Bin K, Inkeyas U *et al.* Detection of *Staphylococcus aureus* in Frozen Chicken Rinse through Bacteriological and Nuc Gene Specific PCR Methods and their Drug Resistance Patterns in Southern

Chittagong, Bangladesh. Res J Microbiol 2014; 9(5): 251-264. doi: 10.3923 / jm.2014.251.264

87. Osman K, Badr J, Al-Maary K, Moussa I, Hessain A, Amin Z et al. Prevalence of the Antibiotic Resistance Genes in Coagulase-Positive-and Negative-*Staphylococcus* in Chicken Meat Retailed to Consumers. Front Microbiol. 2016; 7(22): 1846.

88. Thi XuanThiep D, Thi Kim Ngan H and Tran V. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from pork in Ho Chi Minh City, Vietnam. Agric Sci Res J. 2014; 5(4): 62-67.

89. Yurdakul N, Erginkaya Z, Unal E. Antibiotic Resistance of Enterococci, Coagulase Negative Staphylococci and *Staphylococcus aureus* Isolated from Chicken Meat. Czech J. Food Sci. 2013; 31(1): 14-19. doi: 10.17221/58/2012-cjfs

90. Sakaridis I, Soultos N, Iossifidou E, Papa A, Ambrosiadis I, Koidis P. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Listeria monocytogenes* Isolated in Chicken Slaughterhouses in Northern Greece. J food Prot. 2013; 74(6): 1017-1021. doi: 10.4315 / 0362-028X.JFP-10-545.

91. Indrawattana N, Nibaddhasobon T, Sookrung N, Chongsang-nguan M, Tungtrongchitr A, Makino S et al. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in raw meats marketed in Bangkok and characterization of the isolates by phenotypic and molecular methods. J Health Popul Nutr. 2011; 29(1): 26-38. doi: 10.3329 / jhpn.v29i1.7565

92. Islam M. S, Husna A, Islam M. A, Khatun M. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in Beef, Chevon and Chicken in Bangladesh. Am J Food Sci Health. 2016; 2(4): 39-44. doi: 10.9734/bmrj/2016/25663

93. Pagliano P, Arslan F, Ascione T. Epidemiology and treatment of the commonest form of listeriosis: meningitis and bacteraemia. Infez Med. 2017; 3: 210-216.

94. Lyon S, Berrang M, Fedorka P, Fletcher D, Meinersmann R. Antimicrobial Resistance of *Listeria monocytogenes* Isolated from a Poultry Further Processing Plant. Foodborne Pathog. Dis. 2008; 5: 253-259. doi: 10.1089/fpd.2007.0070
95. Antunes P, Reu J, Sousa N, Pestaña N, Peixe L. Incidence and susceptibility to antimicrobial agents of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* isolated from poultry carcasses in Porto, Portugal. Food Prot. 2002; 65 (12): 1888-1893. doi: 10.4315/0362-028X-65.12.1888
96. Tenson T, Lovmar M, Ehrenberg M. The Mechanism of Action of Macrolides, Lincosamides and Streptogramin B Reveals the Nascent Peptide Exit Path in the Ribosome. J Mol Biol. 2003; 330 (5): 1005-14. doi: 10.1016/S0022-2836(03)00662-4
97. Charpentier E, Courvalin P. Antibiotic resistance in *Listeria* spp. Antimicrob. Agents Chemother. 1999; 43(9): 2103–2108. doi: 10.1016/0140-6736(90)92070-x
98. Godreuil S, Galimand M, Gerbaud G, Jacquet C, Courvalin P. Efflux pump Lde is associated with fluoroquinolone resistance in *Listeria monocytogenes*. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47(2): 704-708. doi: 10.1128 / aac.47.2.704-708.2003
99. Zhang Y, Xu D, Shi L, Cai R, Li C, Yan H. Association Between agr Type, Virulence Factors, Biofilm Formation and Antibiotic Resistance of *Staphylococcus aureus* Isolates From Pork Production. Front Microbiol [Internet] 2018 [consultado 22 Jul 2019]; 9: 1876. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6109666/>
100. Borucki MK, Peppin JD, White D, Loge F, Call DR. Variation in Biofilm Formation among Strains of *Listeria monocytogenes*. Appl Environ Microbiol. 2003; 69: 7336–7342. doi: 10.1128 / AEM.69.12.7336-7342.2003
101. Harvey J, Keenan KP, Gilmour A. Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. Food Microbiol. 2007; 24 (4): 380–92. Doi: 10.1016/j.fm.2006.06.006

102. Li J. Influence of environmental condition on biofilm formation of *Listeria monocytogenes*. Clemson University [Tesis de maestria] South Carolina,EE.UU: Clemson University; 2011
103. Stepanović S, Cirković I, Ranin L, Svabić-Vlahović M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Lett Appl Microbiol*. 2004;38: 428–32. doi: 10.1111/j.1472-765X.2004.01513.x
104. Doijad S, Barbuddhe S, Garg S, Poharkar K, Kaloirey D, Kurkure N et al. Biofilm-Forming Abilities of *Listeria monocytogenes* Serotypes Isolated from Different Sources. *PLoS ONE* [Internet] 2015 [consultado 27 Jul 2019]; 10(9): e0137046. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0137046&type=printable>
105. Pascual Anderson M, Calderón V. Microbiología Alimentaria: Metodología para alimentos y bebidas. 2ª ed. Madrid: Diaz de Santos S.A; 2000. pag. 186-188
106. Creative Commons Attribution. Preparación de Phosphate Buffered Saline (PBS). Standard Operating Procedures (SOPs). [Internet] Laboratorio de Genómica Viral y Humana Facultad de Medicina UASLP, 2008. [consultado 27 Jul 2019] Disponible en: http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell_Buffer_PBS.pdf

9. ANEXOS

ANEXO 1

Preparación de caldo púrpura de bromocresol para fermentación de carbohidratos¹⁰⁵

Peptona	10 g
Cloruro de Sodio	5 g
Extracto de carne	1 g
Púrpura de bromocresol	0,02 g
Agua destilada	1000 mL

Calentar si es necesario para disolver los ingredientes. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$. El pH final debe ser de $6,8 \pm 0,2$. Posteriormente agregar la solución del carbohidrato que se desee, previamente esterilizada por filtración, para obtener una concentración final de 0,5 %.

Principio de acción

Este medio sirve para observar la fermentación de azúcares con producción de acidez.

ANEXO 2

Preparación del caldo nitrato¹⁰⁵

Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
KNO ₃ (libre de nitritos)	1 g
Agua destilada	1000 mL

Disolver los ingredientes en el agua por calentamiento. Distribuir en tubos a razón de 5mL. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. El pH final debe ser 7 \pm 0,2.

Preparación de reactivos para investigar la reducción de nitratos

Reactivo A

Ácido sulfanílico	0,8 g
Ácido acético 5 N	100 mL

Disolver el ácido sulfanílico en el ácido acético por calentamiento suave.

Reactivo C

Alfa naftol	0,5 g
Ácido acético 5 N	100 mL

Disolver el alfa naftol en el ácido acético por calentamiento suave.

ANEXO 3

Preparación de Phosphate Buffered Saline (PBS)¹⁰⁶

La Solución Salina Amortiguada por Fosfatos (PBS) constituye una solución amortiguadora de pH comúnmente empleada para procedimientos bioquímicos.

Procedimiento:

1. Preparar 100 mL de Acido Clorhídrico 1M (1M HCl) agregando 8.62 mL de HCl concentrado a 91 mL de H₂O previamente colocados en un vaso de precipitados de 250 mL. *¡No agregar el agua al ácido!* Mezclar en una plancha agitadora magnética durante 5 minutos. Afore a 100 mL con H₂O.
2. Preparar 100 mL de Hidróxido de Sodio 10M (10M NaOH) agregando 40 g de NaOH a 40 mL de H₂O previamente colocados en un vaso de precipitados de 250 mL. Mezclar con una barra magnética en una plancha agitadora hasta que el NaOH se haya disuelto por completo. Aforar a 100 mL con H₂O. *¡Precaución, esta reacción es exotérmica!*
3. Añadir las sales a un vaso de precipitados adecuado para el volumen de la solución por preparar. De acuerdo a la *Tabla de Preparación* mostrada a continuación.

Tabla de preparación

	Cf	250 mL	500 mL	1000 mL
NaCl	138 mM	2.015 g	4.03 g	8.06 g
KCl	3 mM	0.055 g	0.11 g	0.22 g
Na ₂ HPO ₄	8.1 mM	0.2875 g	0.575 g	1.15 g
KH ₂ PO ₄	1.5 mM	0.05 g	0.10 g	0.20 g
H ₂ O	---	csp 250 mL	csp 500 mL	csp 1000 mL

4. Añadir el 80% del volumen de H₂O requerido y mezclar encima del agitador magnético hasta diluir las sales.
5. Ajustar el pH a 7.4 con 1M HCl o 10M NaOH (según sea necesario) empleando para ello una pipeta de plástico mientras se monitorea el pH. Añadir las soluciones de HCl o NaOH gota a gota.
6. Aforar la solución con H₂O al volumen final requerido.
7. Esterilizar en autoclave.
8. Almacenar a temperatura ambiente (uso rutinario) o bajo refrigeración entre 4 y 8 °C.

ANEXO 4

Tabla 15. Antimicrobianos y diámetros críticos para *Staphylococcus spp.*⁵¹

ANTIMICROBIANO	CONTENIDO DEL DISCO	DIÁMETRO EN mm		
		R	I	S
PENICILINAS				
Penicilina	10 unidades	≤ 28	-	≥ 29
AMINOGLUCOSIDOS				
Gentamicina	10 µg	≤ 12	13 – 14	≥ 15
FLUOROQUINOLONAS				
Norfloxacino	10 µg	≤ 12	13 – 16	≥ 17
Ciprofloxacino	5 µg	≤ 15	16 – 20	≥ 21
TETRACICLINAS				
Tetraciclina	30 µg	≤ 14	15 – 18	≥ 19
MACROLIDOS				
Eritromicina	15 µg	≤ 13	14 – 22	≥ 23
LINCOSAMIDAS				
Clindamicina	2 µg	≤ 14	15 – 20	≥ 21
ANTAGONISTAS DE LA VIA DEL FOLATO				
Trimetoprim/sulfametoxazol	1.25/23.75 µg	≤ 10	11 – 15	≥ 16

R = Resistente, I = Intermedio, S = Sensible

ANEXO 5

Tabla 16. Antimicrobianos y diámetros críticos para *Listeria spp.*⁵¹

ANTIMICROBIANO	CONTENIDO DEL DISCO	DIÁMETRO EN mm		
		S	I	R
PENICILINAS				
Ampicilina	10 µg	≥ 24	–	–
Penicilina	10 unidades	≥ 20	–	–
MACROLIDOS				
Eritromicina	15 µg	≥ 21	16 – 20	≤ 15
ANTAGONISTAS DE LA VIA DEL FOLATO				
Trimetoprim - Sulfametoxazol	1.25/23.75 µg	≥ 19	16 – 18	≤ 15
FLUOROQUINOLONAS				
Ciprofloxacino	5 µg	≥ 23	20 – 22	≤ 19
AMINOGLUCOSIDOS				
Gentamicina	10 µg	≥ 15	13 – 14	≤ 12
GLICOPEPTIDOS				
Vancomicina	30 µg	≥ 17	–	–
LINCOSAMIDAS				
Clindamicina	2 µg	≥ 19	16 – 18	≤ 15
TETRACICLINAS				
Tetraciclina	30 µg	≥ 23	19 – 22	≤ 18

R = Resistente, I = Intermedio, S = Sensible

ANEXO 6

Aislamiento y pruebas de identificación de *Staphylococcus aureus*

Figura 16. Crecimiento en agar Baird Parker

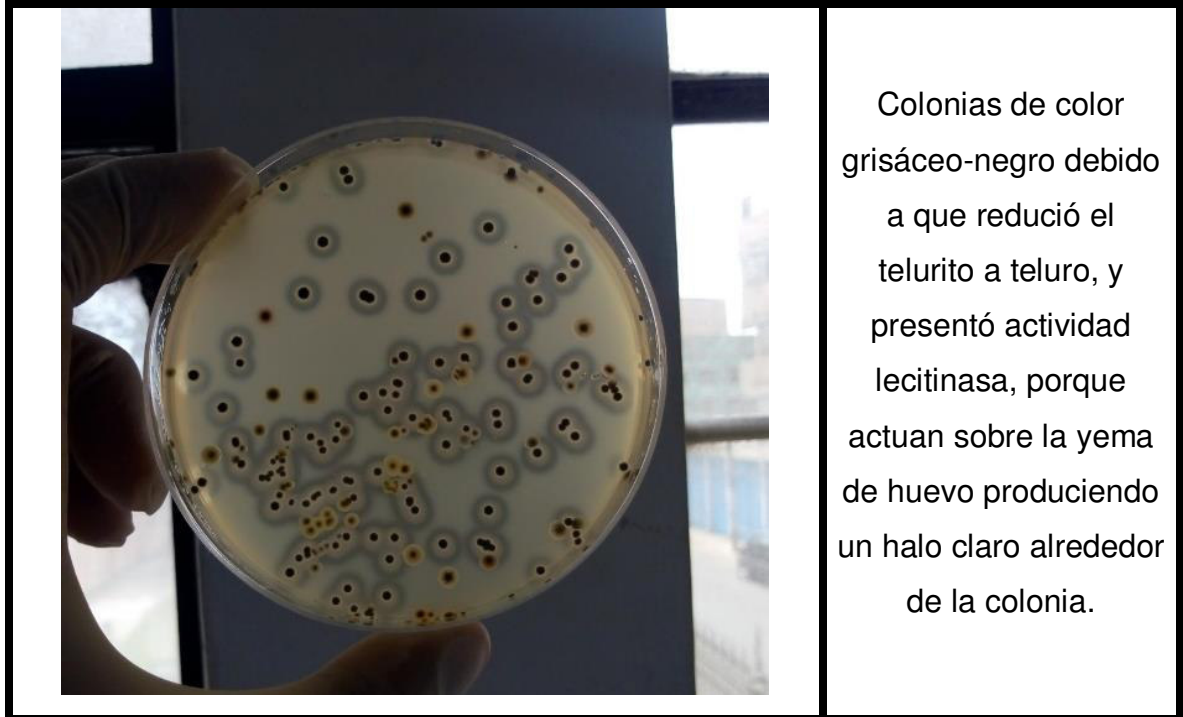


Figura 17. Tinción Gram de *Staphylococcus aureus*

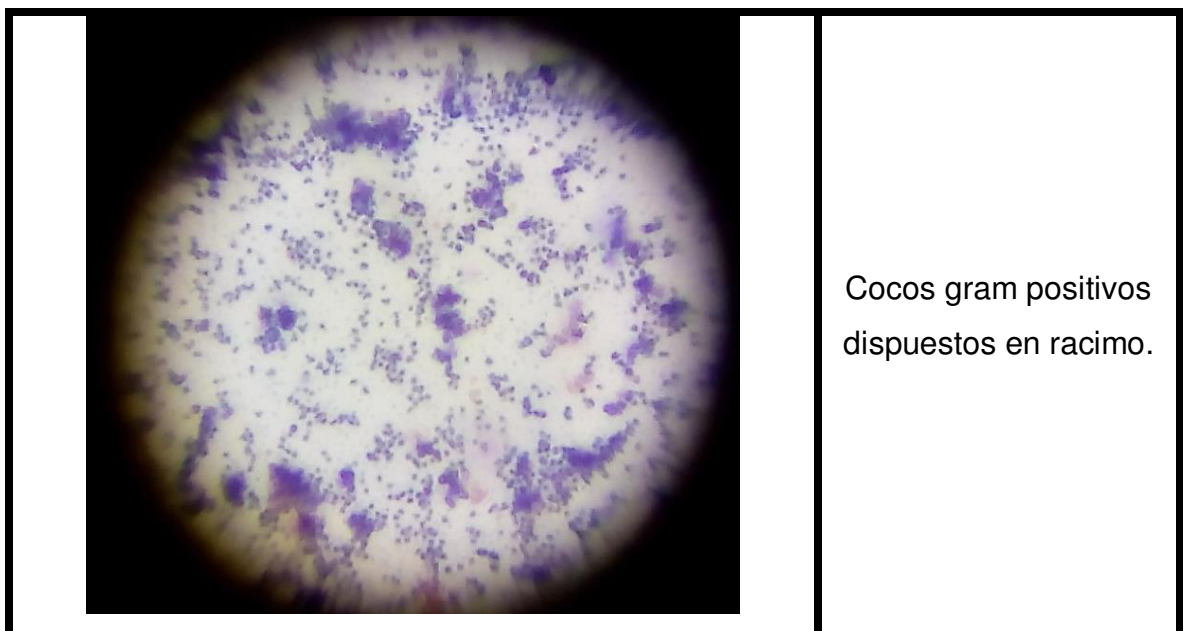


Figura 18. Prueba de coagulasa

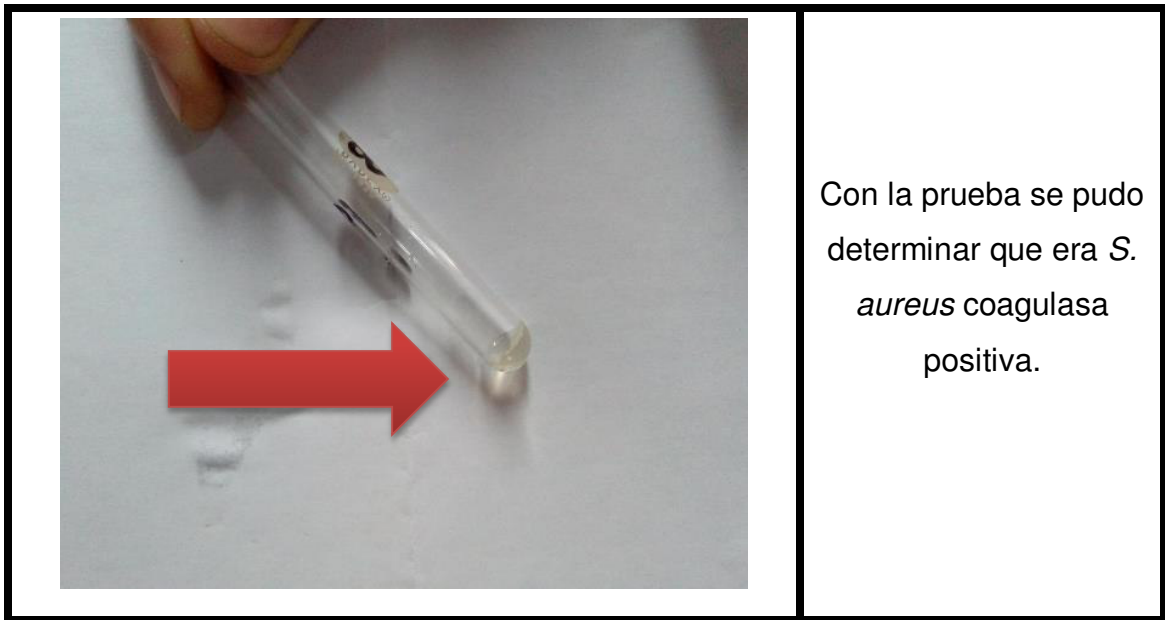


Figura 19. Prueba en agar DNA

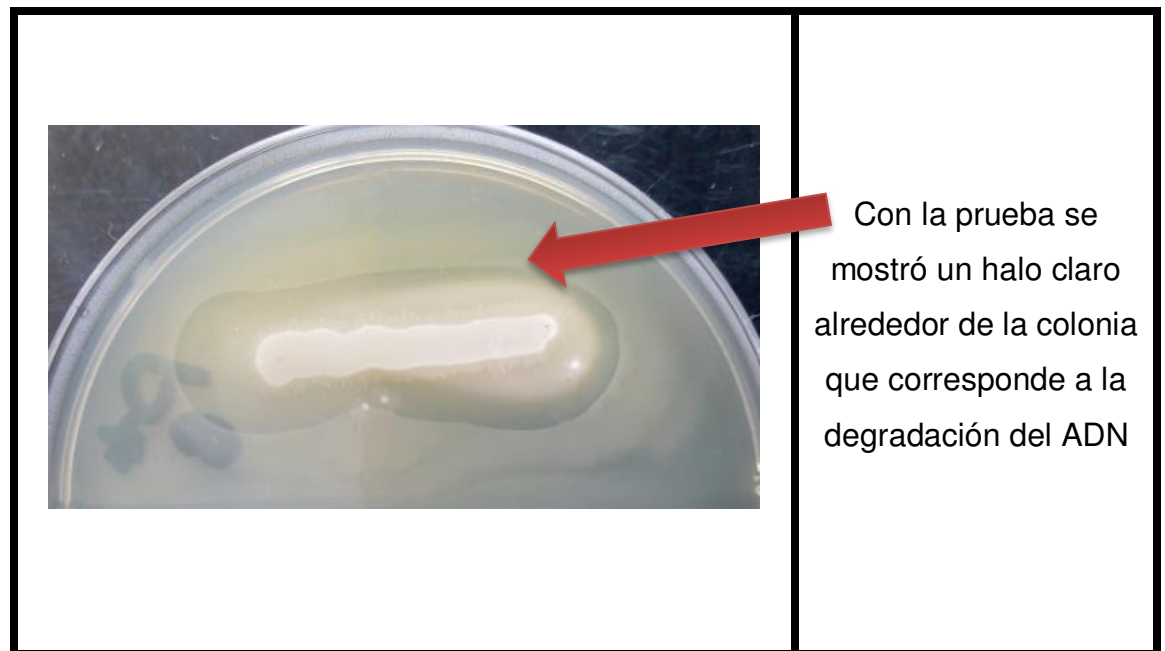


Figura 20. Prueba en agar Manitol Salado

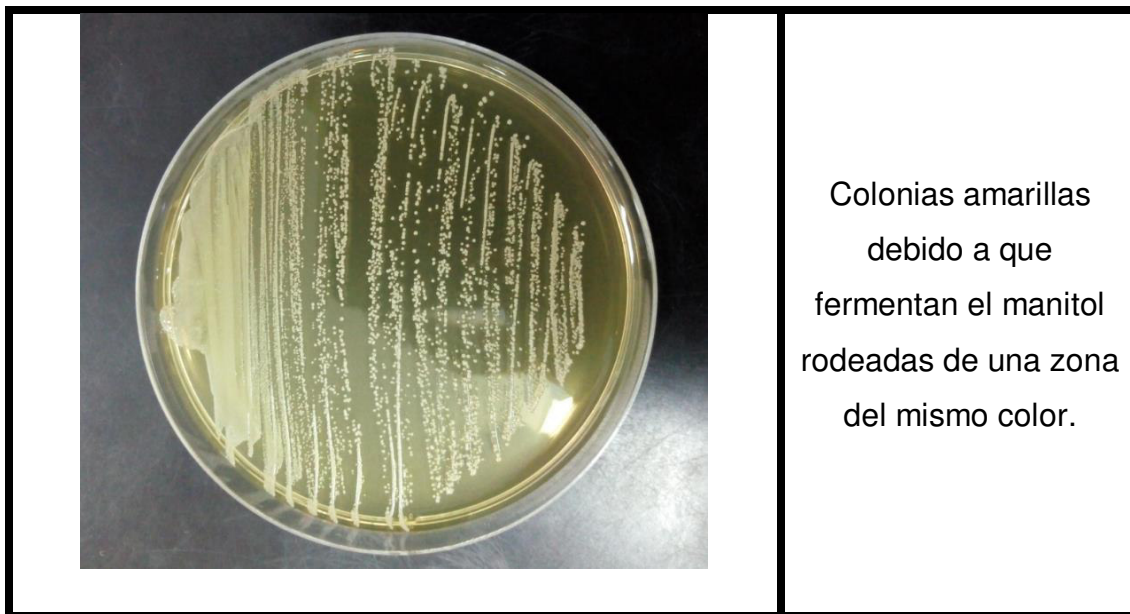
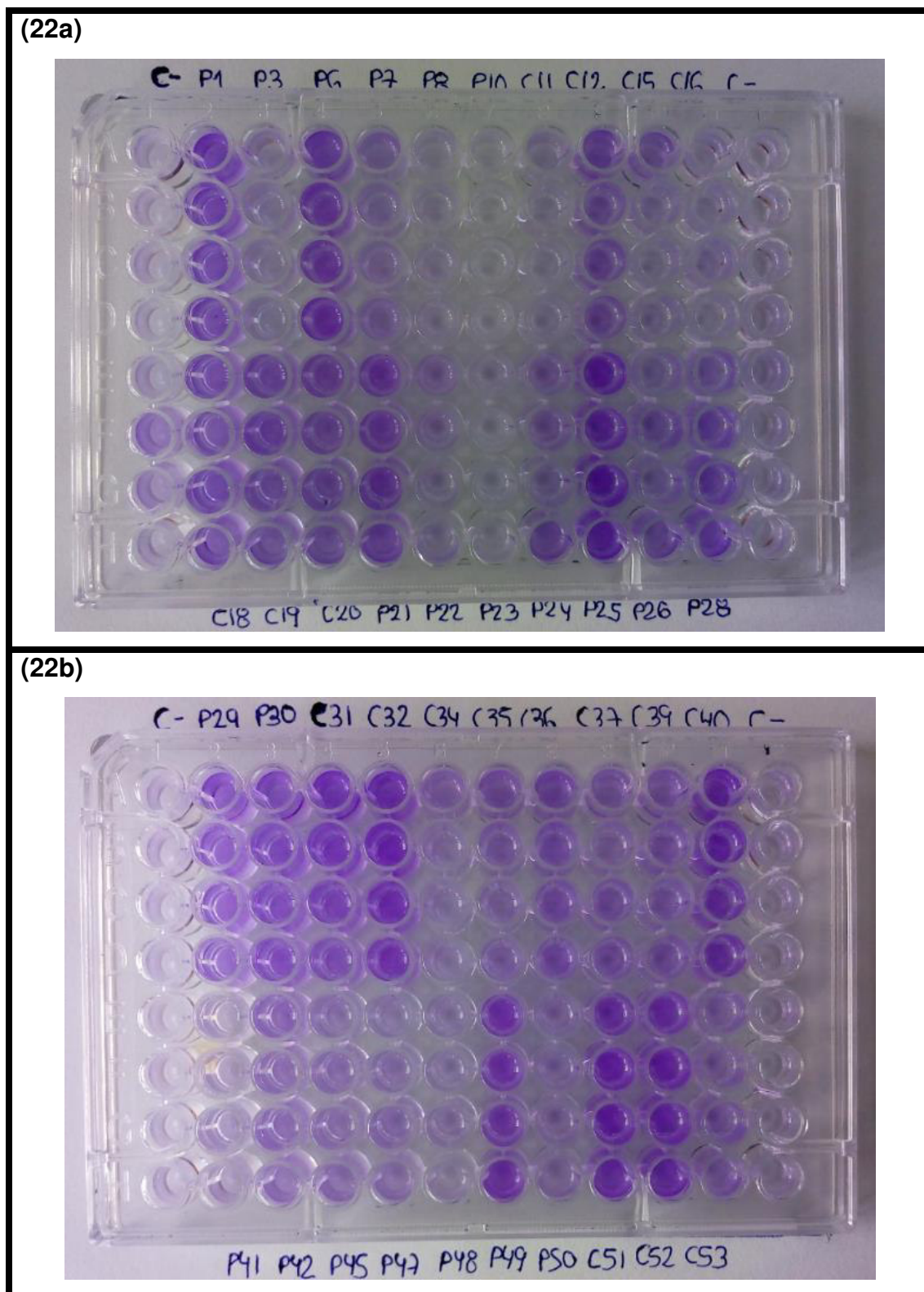


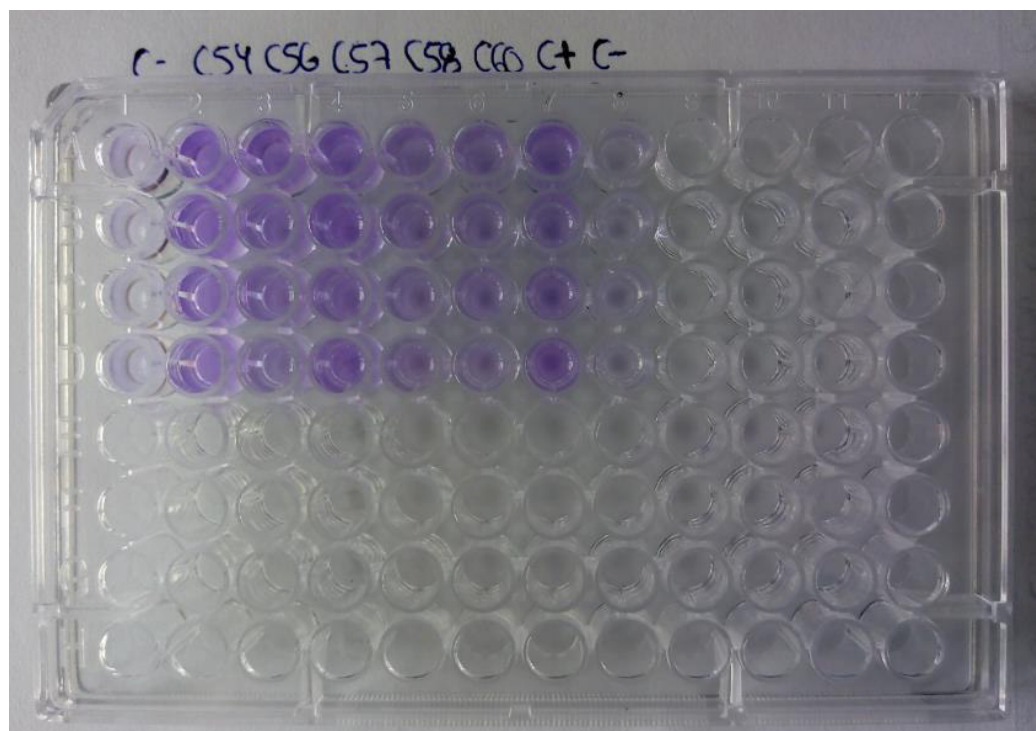
Figura 21. Prueba de sensibilidad por el método de Kirby Bauer para
Staphylococcus aureus



Figura 22. Capacidad de formación de biopelículas de cepas de *Staphylococcus aureus*



(22c)



ANEXO 7

Aislamiento y pruebas de identificación de *Listeria monocytogenes*

Figura 23. Crecimiento en agar Oxford

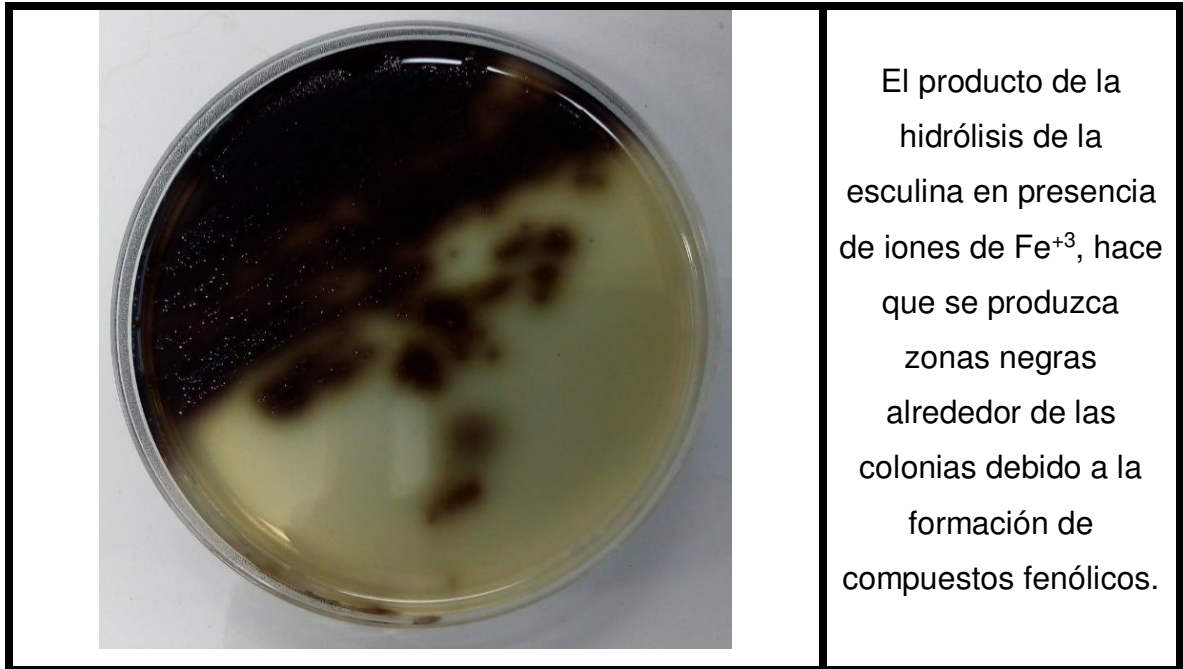


Figura 24. Tinción Gram de *Listeria monocytogenes*

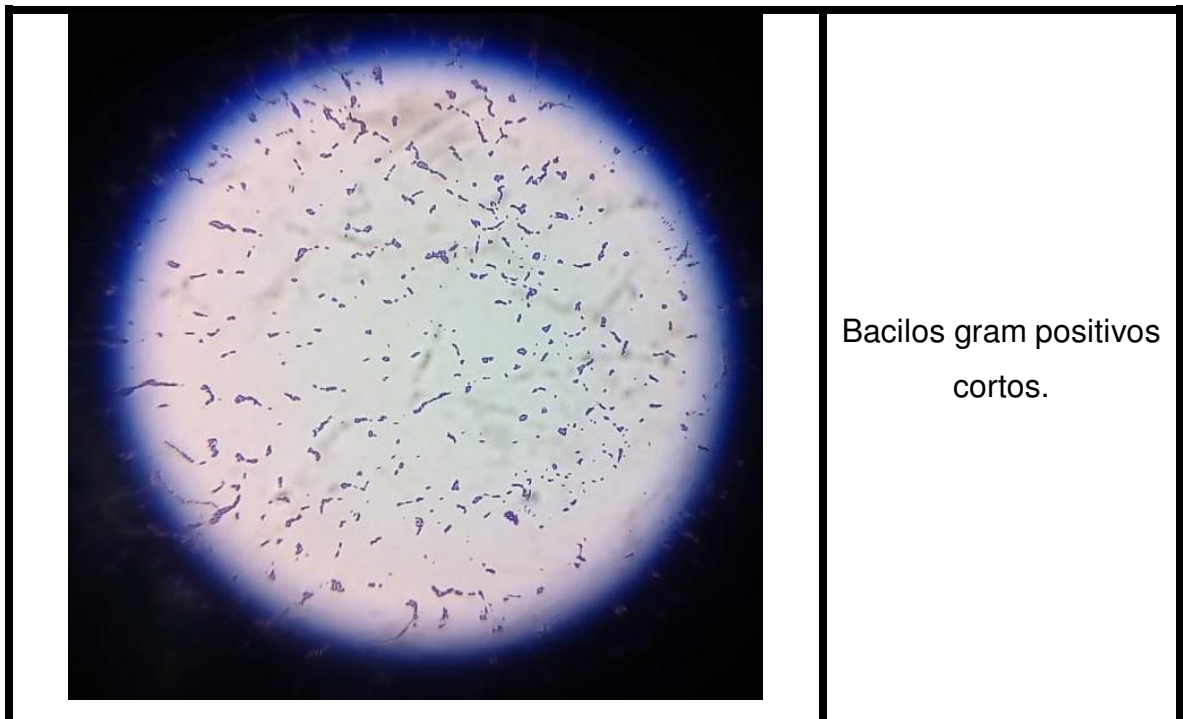


Figura 25. Prueba de catalasa

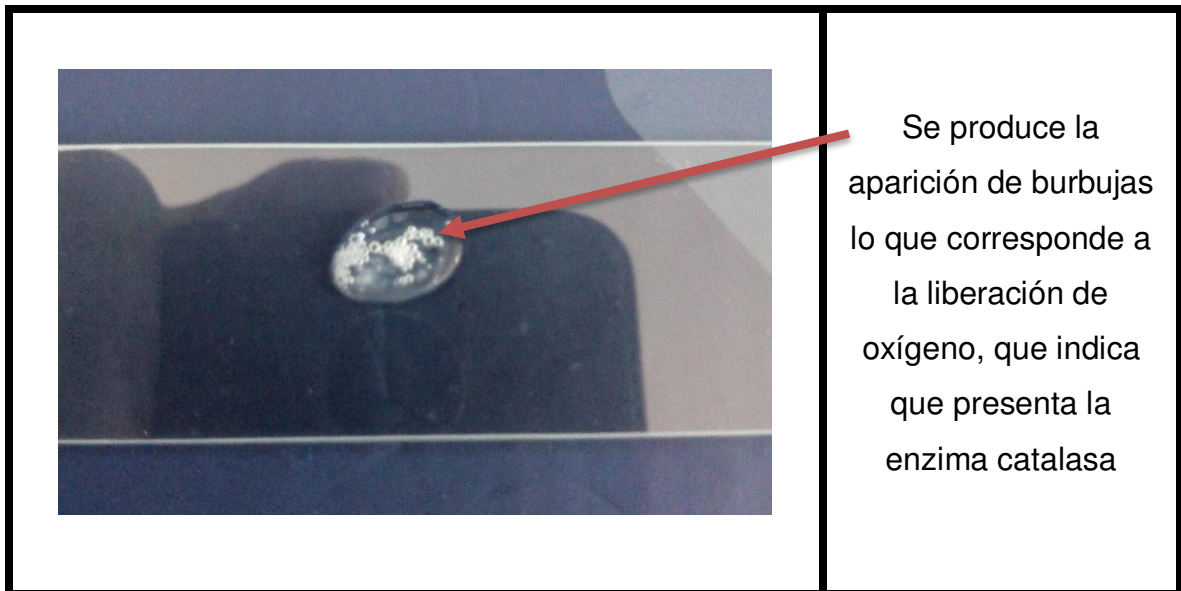


Figura 26. Fermentación de carbohidratos al 5% en caldo púrpura de bromocresol

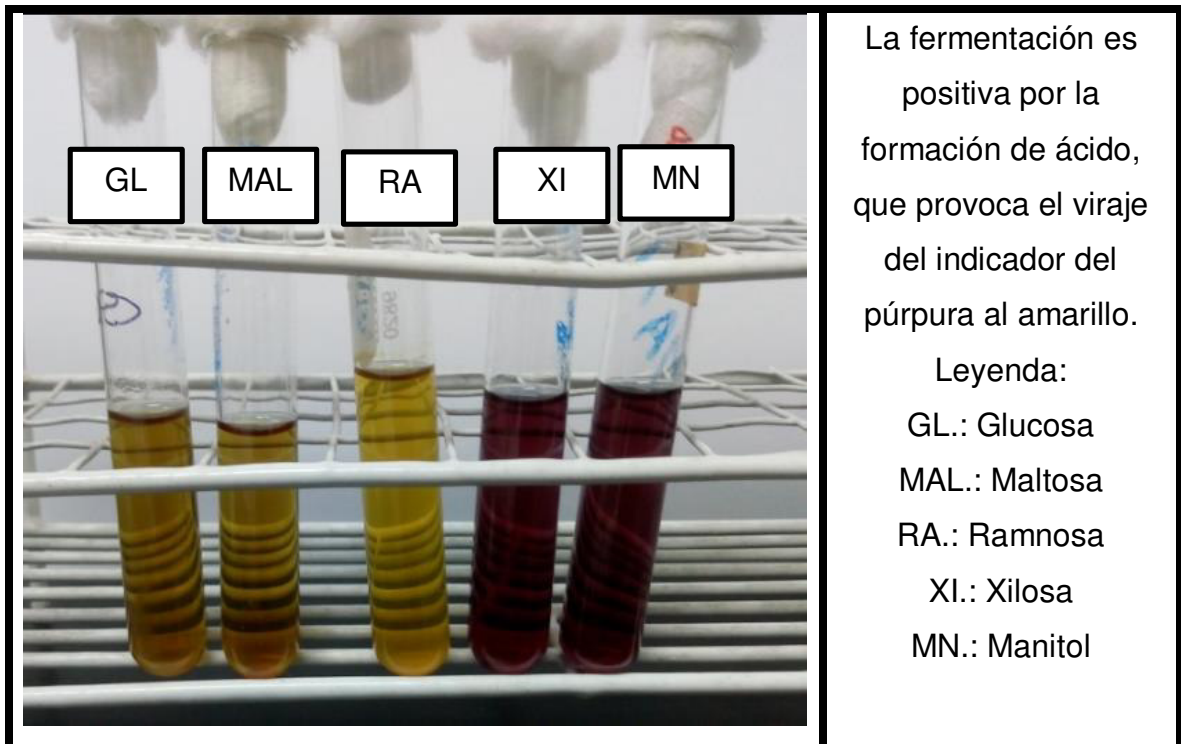


Figura 27. Crecimiento en agar Sangre



Figura 28. Prueba de Movilidad

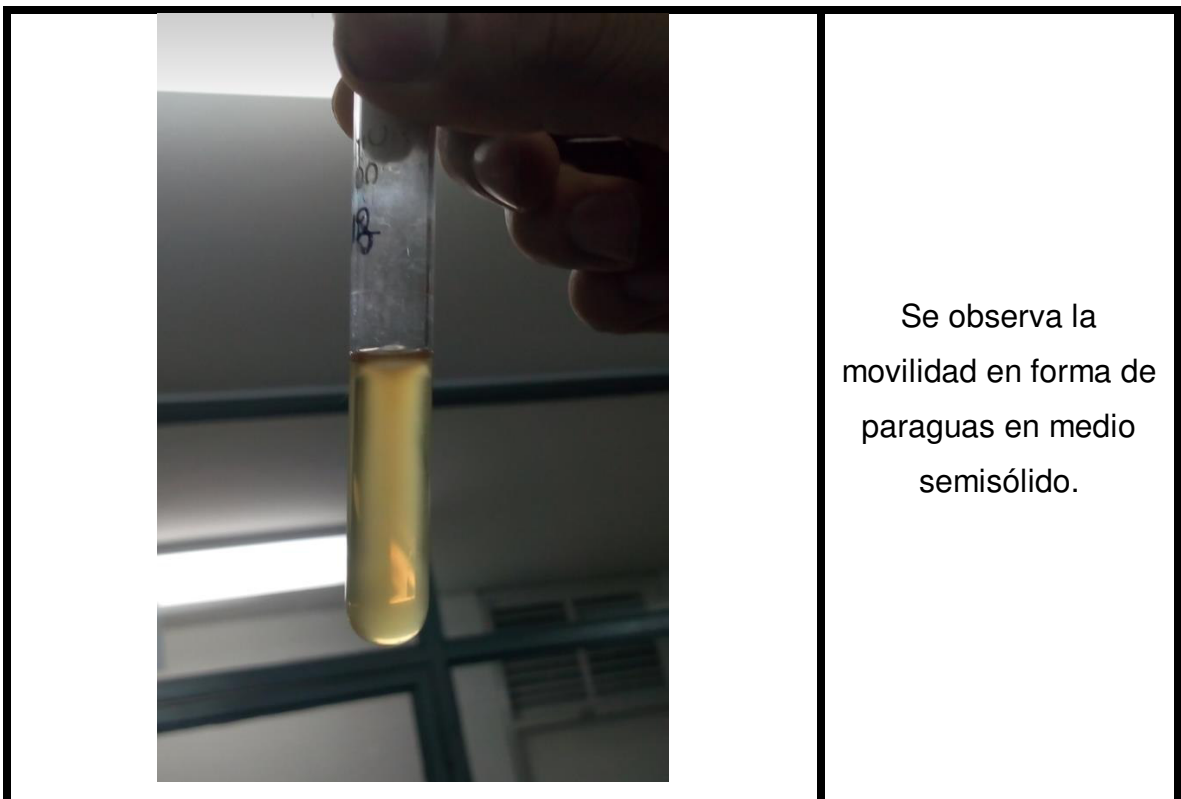


Figura 29. Prueba de CAMP

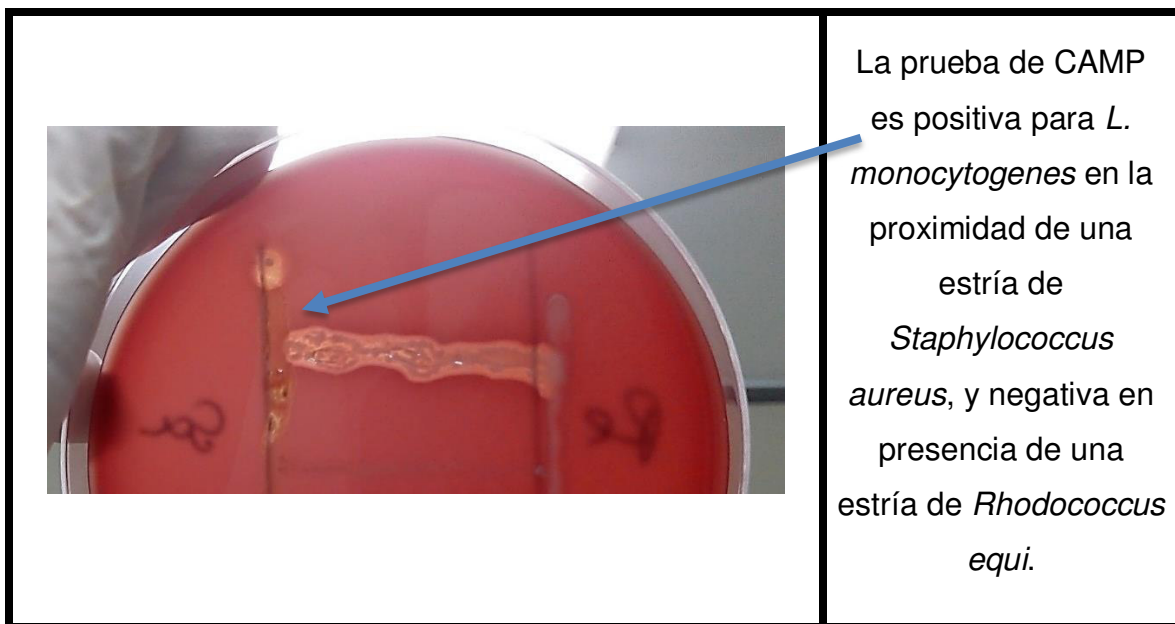
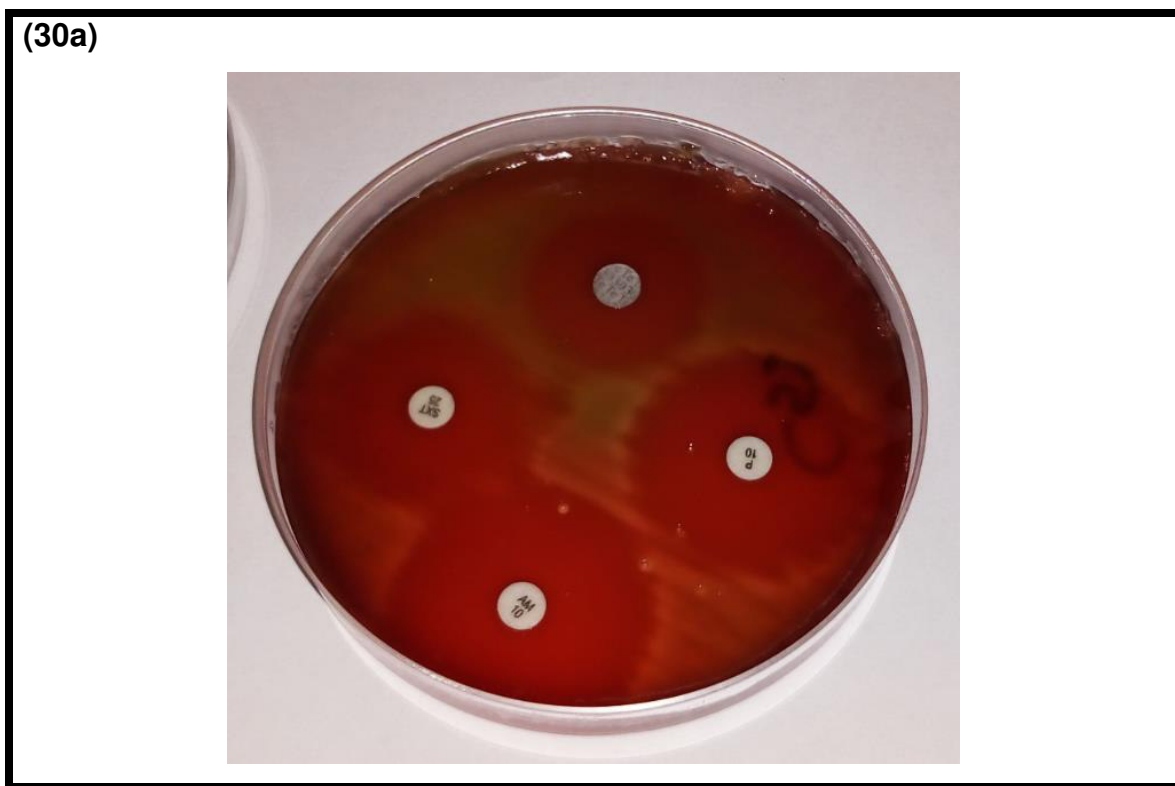


Figura 30. Prueba de sensibilidad por el método de Kirby Bauer para *Listeria monocytogenes*



(30b)

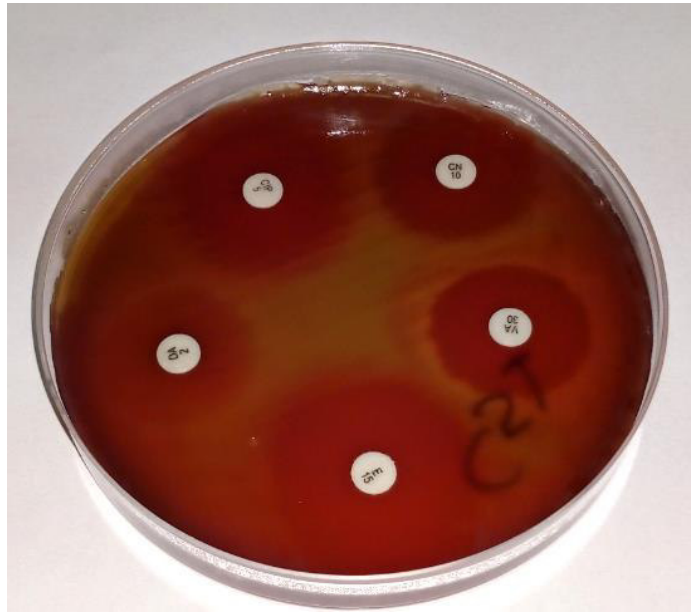


Figura 31. Capacidad de formación de biopelículas de cepas de *Listeria monocytogenes*

